

**A fehérjék konformációs és dinamikai tulajdonságai.
Új eredmények nagy nyomással kombinált
infravörös és fluoreszcencia spektroszkópai
módszerekkel**

MTA Doktori értekezés

Smeller László

Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Budapest

2006/7

Tartalomjegyzék

0. Tartalomjegyzék	1
0.1. Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	6
2. Irodalmi háttér és célkitűzések	8
2.1. A fehérjék felépítése	8
2.1.1. A fehérjeszerkezet szintjei	8
2.1.2. A fehérjék másodlagos szerkezete	10
2.1.3. A fehérje térszerkezetének meghatározására használatos módszerek	11
2.2. Infravörös spektroszkópia	12
2.2.1. Molekularezgések	12
2.2.2. Az N-metilacetamid rezgései	13
2.2.3. A fehérjék infravörös spektroszkópiája	15
2.2.4. A Fourier öndeconvolúció	17
2.2.5. Susi és Byler módszere a fehérje-konformáció meghatározására	19
2.2.6. További módszerek a másodlagos szerkezetnek az infravörös spektrumból való meghatározására	21
2.3. Nagyfelbontású fluoreszcencia technikák	21
2.3.1. A fluoreszcencia vonalkeskenyedési spektroszkópia (FLN)	22
2.3.2. A spektrális lyukégetés technika (SHB)	25
2.3.3. A Laird-Skinner elmélet: a kompresszibilitás meghatározása SHB spektroszkópia segítségével	25
2.4. A nagy nyomás	27
2.4.1. Nagy nyomás hatása kémiai folyamatokra és azok egyensúlyára	27
2.4.2. Nagy nyomás hatása fehérjékre	28
2.4.3. A fehérjék Hawley-féle elliptikus nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja	29
2.5. A vizsgált problémák irodalmi háttere, problémafelvetések és célkitűzések	32
2.5.1. A fehérje-konformáció nyomás hatására történő változásainak infravörös spektroszkópiai jellemzése (T1)	32
2.5.2. A hidrogén/deutérium kicserélődés és a konformációs változások egymásra hatása (T2)	34

2.5.3. A fehérje felgombolyodás (folding), misfolding: intermedier állapotok keltése nagy nyomással. (T3, T7).....	35
2.5.4. A fehérje dinamikájának jellemzése kompresszibilitás- méréssel. (T4)	36
2.5.5. A hideg-, nyomás- és hődenaturált fázisok szerkezeti összehasonlítása (T5).....	37
2.5.6. A tormaperoxidáz enzim extrém stabilitásának strukturális alapjai (T6).....	38
2.5.7. Kis hő-sokk fehérjék: az oligomeren belüli intermolekuláris kölcsönhatások és a chaperon aktivitás kapcsolata. (T8)	39
2.5.8. A NADPH protoklorofillid oxidoreduktáz enzim kinetikájának vizsgálata, a protoklorofillid fototranszformációjának és az azt követő strukturális átalakulások aktivációs paramétereinek meghatározása (T9)	41
2.4.9. A metodikai fejlesztések háttéré és motivációi (T10, T11).....	42
3. Módszerek	44
3.1. Nagy nyomás előállítása és mérése	44
3.2. Az infravörös mérések	46
3.3. 2D korrelációs FTIR spektroszkópia	46
3.4. Nagyfelbontású fluoreszcencia spektroszkópia (Fluorescence Line Narrowing, FLN).....	48
3.5. A vizsgált fehérjék	49
4. Új tudományos eredmények	51
4.1. A fehérjék másodlagos szerkezetének nyomás hatására történő elasztikus változásának kvantitatív jellemzése <i>in situ</i> nyomáskísérletekben FTIR spektroszkópia segítségével.	51
4.1.1. A gramicidin A nyomás által indukált strukturális átalakulása.....	52
4.1.2. A marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (BPTI)	56
4.2. A H/D kicserélődés és a konformáció-változások egymásra hatásának vizsgálata 2D korrelációs FTIR spektroszkópiával	61
4.2.1. A marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (BPTI)	62
4.2.2. A szója lipoxigenáz.....	64
4.3. A nyomás-denaturácót követő újragombolyodás során intermedier állapotok keletkeznek, melyeknek fokozott aggregációra való hajlamuk van	69

4.3.1. Lószív mioglobín.....	69
4.3.2. Szója lipoxigenáz.....	75
4.4. Fehérje-kompresszibilitás mérése nagy nyomáson fluoreszcencia vonal-keskenyedés méréssel.....	76
4.4.1. A kompresszibilitás számolása FLN spektroszkópiai mérésekből. Elméleti eredmények.....	77
4.4.2. A modell próbája szerves mátrixba ágyazott kromofórral	79
4.4.3. A tormaperoxidáz enzim kompresszibilitása.....	85
4. 5. A hő- nyomás- és hidegdenaturált fehérjeállapotok összehasonlítása FTIR spektroszkópiával és termodinamikai analízissel	89
4.5.1. A natív szerkezet.....	89
4.5.2. A hideg denaturáció.....	90
4.5.3. A nyomás-denaturáció	94
4.5.4. A hődenaturáció.....	96
4.5.5. A hideg- nyomás- és hődenaturáció összehasonlítása.....	97
4. 6. A tormaperoxidáz enzim stabilitásának szerkezeti alapjai és ezek összefüggése a fehérje aggregációs hajlamával.	99
4.6.1. A tormaperoxidáz nyomás-denaturációja	99
4.5.2. A fémmentes mezoporfírint tartalmazó HRP	103
4.6.3. Apo-tormaperoxidáz	104
4.6.4. Csökkentett Ca^{2+} -tartalmú fehérje	105
4.6.5. Szubsztrát kötés hatása a HRP stabilitására.....	107
4.6.6. A diszulfid hidak redukálásának hatása a HRP stabilitására	109
4.6.7. A tormaperoxidáz aggregációra való hajlama denaturáló nyomásciklus után	110
4. 7. A fehérjék elliptikus fázisdiagramjának kiterjesztése, az aggregált és intermedier állapotok figyelembevétele a fázisdiagramon.....	112
4.7.1. Az elliptikus fázisdiagram alakját befolyásoló paraméterek.....	112
4.7.1.1. A másodrendű tagok hatása az elliptikus fázisdiagramra.....	113
4.7.1.2. A harmadrendű tagok hatása az elliptikus fázisdiagram alakjára....	116
4.7.2. Kibővített fázisdiagram a fehérje-fehérje kölcsönhatások figyelembe vételével.....	119

4.8. Kis hő-sokk fehérjék oligomerizációjának és chaperon funkciójának kapcsolata. (T8, P16, P19)	122
4.8.1. Az α -krisztallin chaperon aktivitásának nyomással történő indukálása	122
4.8.2. A <i>Methanococcus jannaschii</i> -ből izolált hőtűrő kis hő-sokk fehérje (MjHSP 16,5)	129
4.9 A protoklorofillid fototranszformációjának és az azt követő Shibata-eltolódás aktivációs paramétereinek meghatározása.....	133
4.9.1 Az etiolált búzalevél homogenátum és az intakt levél összehasonlítása.....	134
4.9.2. A protoklorofillid foto-transzformációjának vizsgálata	135
4.9.3. A Shibata eltolódás vizsgálata	141
4.10. Módszer kifejlesztése a fehérjék FTIR spektrumának analizálásához szükséges Fourier öndeconvolúció optimális paramétereinek meghatározására	147
4. 11. A spektroszkópiában alkalmazott csúcspozíció-meghatározás pontosságának analízise. Matematikai formulák megadása, melyek segítségével a mért spektrumból a csúcspozíció hibája is kiszámolható. A módszer alkalmazása a nyomásértékek pontosságának meghatározására.	156
4.11.1. A csúcspozíció statisztikus hibája	157
4.11.2. A statisztikus hiba emissziós spektroszkópia esetén	158
4.11.3. A statisztikus hiba abszorpciós spektroszkópia esetén	159
4.11.4. A nyomáskalibráció pontosságának becslése belső kalibránsok csúcs-pozíciójának a hibájából.....	163
5. A bemutatott új tudományos eredmények tézispontokban való összefoglalása	166
6. Köszönetnyilvánítás	170
7. A tézispontokhoz kapcsolódó saját közlemények jegyzéke (P1-P20).....	171
8. Irodalomjegyzék.....	173

0. 1. Rövidítések jegyzéke

ANS	8- anilino -1- n aphthalenesulphonic acid (8-anilino-1-naftalén-szulfonsav)
BES	N,N- bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulphonic acid (N,N-bisz(2-hidroxiethyl)-2-aminoetánszulfonsav)
BPTI	b ovine p ancreatic t rypsin i nhibitor (marha hasnyálmirigy tripszin gátló fehérje)
BHA	b enzohydroxamic acid (benzohidroxámsav)
CD	c ircular d ichroism (cirkuláris dikroizmus)
DAC	d iamond a nvil c ell (gyémánt nyomáscella)
DMSO	d imetil-szulfoxid
DOPC	d ioleoyl- p hosphatidyl c holine (dioleoil-foszfatidilkolin)
DTE	d ithioerythritol (ditoeritritol)
EDTA	e thylen d iamin e tetraacetic a cid (etilén-diamin-tetraecetsav)
FLN	f luoreszcencia l ine n arrowing (fluoreszcencia vonalkeskenyedés, egy nagyfelbontású fluoreszcencia spektroszkópiai módszer)
FTIR	F ourier t ransformation i nfrared (Fourier transzformációs infravörös)
HRP	h orseradish p eroxidase (tormaperoxidáz enzim)
IDF	i nhomogenous d istribution f unction (inhomogén eloszlásfüggvény)
NMR	n uclear m agnetic r esonance (mágneses rezonancia)
NADPH	n icotinamide a denine d inucleotide p hosphate (nikotinsavamid-adenozin-dinukleotid-foszfát-hidrogén)
MCT	m ercury c admium t elluride (higany-kadmium-tellurid)
MgMP	m agnézium- m ezoporfirin
MjHSP16,5	<i>Methanococcus jannaschii</i> h eat s hock p rotein (a <i>Methanococcus jannaschii</i> archebaktériumból izolált 16,5 kDa molsúlyú hő-sokk fehérje)
mtsai	munkatársai
SHB	s pectral h ole b urning (spektrális lyukégetés)
TRIS	t ris(hydroxymethyl)methylamine
VCD	v ibrational c ircular d ichroism (vibrációs cirkuláris dikroizmus)

1. Bevezetés

A fehérjék az élő szervezetet felépítő biomolekulák egyik meghatározó csoportját alkotják. Szerkezetükben az unikális és az univerzális elemek sajátos egyensúlya valósul meg. Így, amellet, hogy például egyedi enzimfunkciókat látnak el, számos közös tulajdonsággal is rendelkeznek (Creighton, 1993). Munkámban az egyes fehérjékre speciálisan jellemző adatok meghatározása mellett, a fehérjék közös tulajdonságainak megragadására is törekedtem.

Biológiai rendszerekben a fehérjékhez köthető folyamatok általában állandó hőmérsékleten és nyomáson zajlanak le. Ez azonban nem zárja ki azt, hogy a fehérjék tulajdonságairól többet tudjunk meg azáltal, hogy a szervezetben uralkodótól eltérő fizikai paraméterek mellett vizsgáljuk azokat. A fehérjék hőmérséklettől függő tulajdonságaira irányuló mérések a modern biofizika világában mindennaposak. Ehhez képest indokolatlanul kevés munka vizsgálja a másik – tulajdonképpen a hőmérséklettel egyenrangú – termodinamikai paraméternek, a nyomásnak a biológiai rendszerekre kifejtett hatását. Ennek a hiánynak két fő oka van: az egyik a technikai nehézségek sora, a másik a kutatók körében tapasztalható idegenkedés a fizioiogiástól nagymértékben eltérő környezeti paraméterektől. Meg kell jegyezni, hogy a fehérjék esetén a leggyakrabban vizsgált hőmérséklettartomány a fizioiogiás hőmérséklettől mintegy $\pm 20\%$ -os mértékben tér el (K-ben mérve). Ezzel szemben a biofizikai mérések szempontjából releváns nyomástartomány az atmoszferikus nyomás ezer ill. tízezerszereséig terjed. Ez a nagyságrendi különbség megmagyarázza a biológiai irányultságú kutatóknak a nagy nyomáson végzett vizsgálatokkal szembeni idegenkedését, valamint a mérésekkel járó technikai nehézségeket is.

A legelső olyan publikáció, amely a nagy nyomásnak a fehérjékre gyakorolt hatását írta le, még a múlt század elején született (Bridgmann, 1914). A téma azonban hosszú időre feledésbe merült, hiszen ekkor még a fehérjék térszerkezete egyáltalán nem volt ismert, erre még több évtizedet kellett várni. A nyomás felhasználásával végzett fehérjekutatás a múlt század hetvenes-nyolcvanas éveiben indult újra, és

igazán az 1990-es években, a modern szerkezetvizsgáló fizikai és biofizikai módszerek elterjedésével lendült fel.

Munkám során ebbe a kutatásba kapcsolódtam be főleg infravörös spektroszkópai mérések ill. kisebb részben fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok végzésével, melyekben különféle fehérjék tulajdonságait mértem, mialatt azok nagy nyomás hatásának voltak kitéve. (Nagy nyomás alatt a továbbiakban a 100 MPa – 1 GPa tartományt fogom érteni.)

Az enzimfehérjék egyik sajátos tulajdonsága az, hogy nagy nyomás hatására ugyanúgy elvesztik az enzimműködéshez szükséges térszerkezetüket, mint ahogyan az magas hőmérsékleten is bekövetkezik. A kutatás egyik fő iránya ennek a nyomás-denaturációnak a jellemzése, termodinamikai paramétereinek meghatározása, valamint a fehérje szerkezetében nagy nyomás alatt létrejövő elasztikus és plasztikus konformáció-változásainak meghatározása volt.

A vizsgálatok egy másik része a fehérjék általánosan elfogadott elliptikus fázisdiagramjának kiterjesztésére irányult, mely során megpróbáltam figyelembe venni az intermedier fehérje-konformációkat is, valamint leírni az egyedi fehérjeláncok közti kölcsönhatás révén létrejött aggregációs állapotot is. Ehhez kapcsolódott olyan fehérjék vizsgálata, ahol a természetben előforduló forma egy speciális oligomer szerkezet, amelyet több - másodlagos kötésekkel összekapcsolt - polipeptidlánc alkot.

Egy további irány a fehérje dinamikájának a kompresszibilitás mérésén keresztül történő jellemzése, amit egy speciális fluoreszcencia spektroszkópai módszer alkalmazásával értem el.

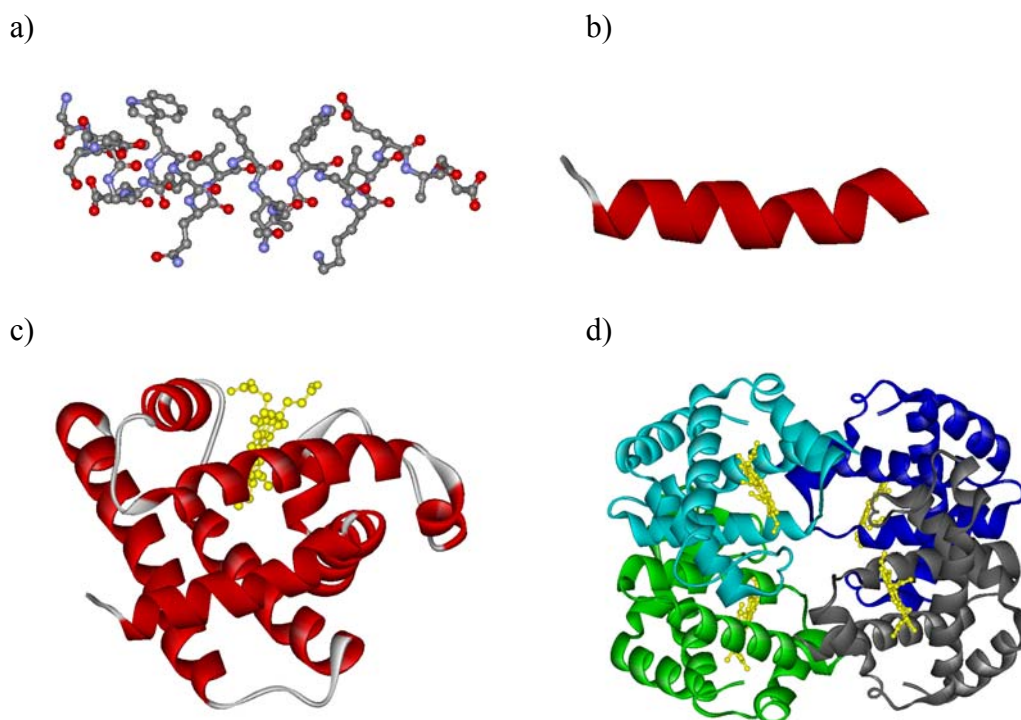
Természetesen a külső nyomás az enzimfehérjék működését és az enzimkinetikát abban a nyomástartományban is befolyásolja, ahol a fehérje még nem denaturálódik. A nagy nyomásnak a kinetikára gyakorolt hatásából olyan, az enzimfunkcióra jellemző termodinamikai paraméterek számíthatók ki, mint az aktivált állapothoz kapcsolódó térfogatváltozás, ill. a biokémiai folyamathoz tartozó térfogatváltozás. Ez nagyon jól példázza, hogy a fiziológiás körülményektől nagyon eltérő környezetben végzett mérések is adhatnak olyan információt, amely a fiziológiás körülmények között lezajló reakciók fontos tulajdonságait tárja fel.

2. Irodalmi háttér és célkitűzések

2.1. A fehérjék felépítése

2.1.1. A fehérjeszerkezet szintjei

A fehérjék aminosavakból felépült polimer makromolekulák (Creighton, 1990). A molekulát 20-fajta aminosav lánc alkotja, melyek az ún. peptidkötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Egy tipikus fehérjét száz – néhány száz monomer alkot. A molekula gerincét alkotó kötések körül (a peptidkötés kivételével) rotáció lehetséges. Ez aminosavanként két rotációs lehetőséget rejt. Ezért a fehérjeláncnak sokféle



1. ábra. Másodlagos, harmadlagos és negyedleges fehérjeszerkezet. A mioglobin első 20 aminosavja által alkotott alfa hélix kétféle ábrázolásban: a) az összes (hidrogénnél nagyobb tömegű) atom megjelenítésével, b): egyszerűsített szalag ábrázolással, c) a molekula teljes térszerkezete. d) A négy polipeptid láncból felépült hemoglobin tetramer negyedleges szerkezete. (Az ábrát a Protein Data Bank, (www.rcsb.org/pdb/) 1YMB és 1A3N pdb fájljaiból a Viewerlite program segítségével készítettem.)

konformációja valósulhat meg. A fehérjék térszerkezetében a következő szinteket különböztetjük meg (1. ábra):

- Az elsődleges szerkezetet az aminosavak sorrendje jelenti a láncban (szekvencia).
- A másodlagos szerkezet a fehérjelánc rövid távú rendezettségét írja le, amely leggyakrabban helikális, vagy lemezszerű. Egy ilyen másodlagos szerkezeti elem tipikusan 10-20 aminosavat foglal magában.
- Harmadlagos szerkezetnek a másodlagos szerkezeti elemek által a térben kialakított alakzatot nevezzük.
- Negyedleges szerkezetről csak akkor beszélünk, ha a fehérjét több különálló polipeptid lánc alkotja, ekkor a polipeptid láncok egymáshoz rendeződése által alkotott elrendeződést nevezzük negyedleges szerkezetnek.

A fehérjébe beágyazódhatnak olyan kisebb molekulák, amelyek nem aminosavakból épülnek fel. Ilyen például a mioglobinban és a hemoglobinban levő vas-protoporfirin. Ezeket a molekulákat prosztetikus csoportoknak nevezzük.

A fehérje másodlagos szerkezetének stabilizálásában a legnagyobb szerepet a hidrogénhid kötések játszik (ld. 2.1.2.).

A fehérje harmadlagos szerkezetét stabilizálhatják a cisztein aminosavak közti diszulfid híd kötések is, amelyek a polipeptid láncon távoli, de a térszerkezet hajtogatódása során a térben egymáshoz közel került aminosavakat kötnek össze kovalens módon.

A fehérje belsejében lehetnek még kötött fémionok is (pl. Ca^{2+}) amelyek több, a fehérjeszerkezet hajtogatódása miatt egymáshoz térben közel kerülő aminosavval létesítenek kölcsönhatást, így stabilizálják a másodlagos és harmadlagos szerkezetet.

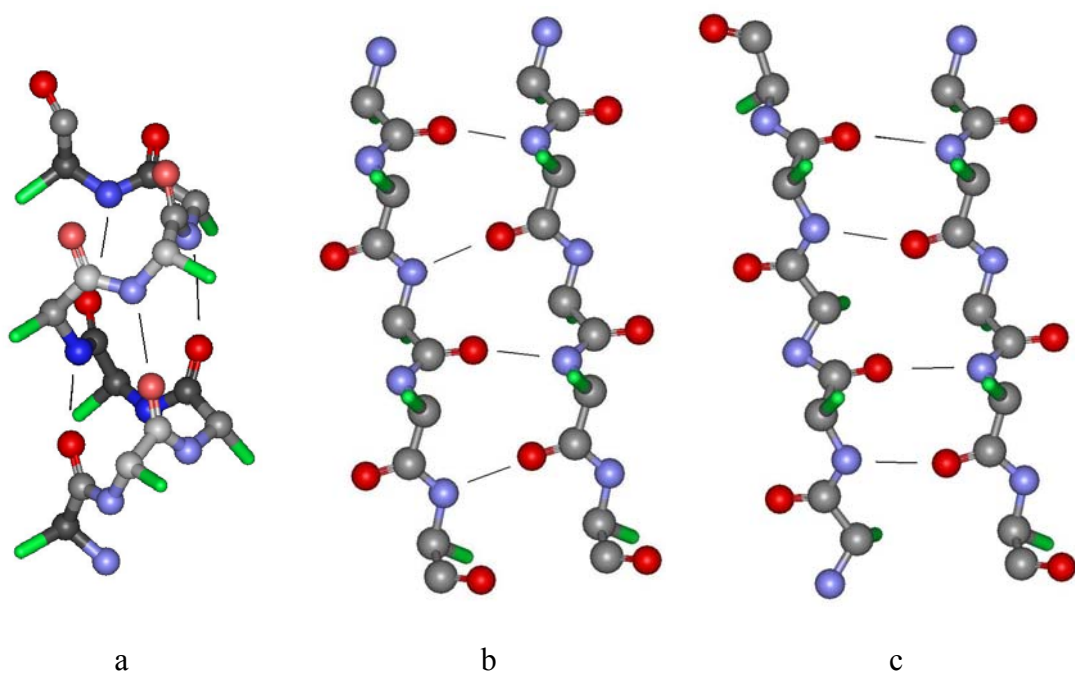
A fentiek alapján, ha az összes lehetséges konformert figyelembe vesszük, akkor egy fehérje molekula lehetséges konformációinak száma csillagászatian nagy szám. (Levinthal, 1968). A fehérjék döntő többségének van egy kitüntetett ún. *natív* állapota. Ebben az állapotban képes a biológiai rendszerben rá háruló feladatot elvégezni (pl. enzimatis aktivitást mutatni). Termodinamikai értelemben a natív állapot makroállapotnak tekinthető, azaz nem egyetlen konformáció tartozik hozzá. Karplus és Petsko (1990) megmutatták, hogy a fehérje enzimatis működéséhez szükséges bizonyos mértékű flexibilitás, azaz a fehérje a natív szerkezetében

enzimműködés közben több konformációs mikroállapotot is felvesz. Azon konformációk sokaságát, amelyek másodlagos szerkezet nélküliek, vagy legalábbis a natívhoz képest nagyon kevés másodlagos szerkezeti elemet tartalmaznak, a fehérje denaturált, vagy kitekeredett (unfolded) állapotának nevezzük.

2.1.2. A fehérjék másodlagos szerkezete

Mivel az általam végzett vizsgálatok nagy része a fehérje másodlagos szerkezetére irányult, a fehérjékben előforduló másodlagos szerkezeti elemeket részletesebben mutatom be.

A rendezett másodlagos szerkezetnek két fő fajtája van, a helikális és a lemezes alakú. (2. ábra)



2. ábra. A fehérjék másodlagos szerkezeti elemei. a) Az α -hélix, b) a parallel, ill. c) az antiparallel β szerkezet részletei. A vonalak a hidrogénhíd kötések jelölik. A zöld rudak az oldalláncok csatlakozási pontjai. A szürke golyók a szén, a kékek a nitrogén, a pirosak pedig az oxigén atomokat jelölik. (A hidrogén atomok az áttekinthetőség kedvéért nincsenek jelölve.)

A helikális szerkezetek közül a leggyakoribb az ún. α -hélix (2. ábra). Ezen kívül még az általam vizsgált fehérjékben a 3_{10} -hélix fordult elő. A két hélix a menetemelkedésében különbözik egymástól. Az α -hélixben egy fordulatra 3,6 aminosav jut, amelyek így egymáshoz képest 100° -kal vannak elfordulva. Az α -hélix menetemelkedése 5,41 Å. A 3_{10} hélix elnyújtottabb: 3 aminosav esik egy fordulatra, de egy körbefordulás 6 Å magasságú. Mindkét hélixet hidrogénhid kötések stabilizálják. Ezek az i -edik aminosav oxigénje és α -hélixben az $i+4$ -edik, 3_{10} hélixben pedig az $i+3$ -adik aminosav hidrogénje között alakulnak ki.

A lemezes szerkezetnek is két fajtája van a parallel és az antiparallel β -lemez. Ezekben a polipeptid szálak kinyújtott állapotban helyezkednek el. A parallel β -lemezben a láncok egymással párhuzamosan egy irányba futnak, míg a gyakrabban előforduló antiparallel esetben a láncok párhuzamosak, de egymással ellentétes irányultságúak. Az aminosavak oldalláncai a lemez síkjára merőlegesen helyezkednek el.

Ezeket a rendezett szerkezeti elemeket struktúra nélküli rendezetlen láncdarabok ill. meghatározott struktúrájú hurkok köthetik össze.

2.1.3. A fehérje térszerkezetének meghatározására használatos módszerek

A fehérjék szerkezetének vizsgálatára számos módszer ismert, melyek bonyolultsága és pontossága jelentősen eltérő. Amennyiben a fehérje kristályosítható, akkor röntgendiffrakciós módszerrel az elektronsűrűség meghatározható. Mivel a szekvencia általában ismert, azt az elektronsűrűséghez lehet illeszteni, így a térszerkezetre atomi felbontású eredményt kaphatunk, azaz minden (hidrogénnél nagyobb tömegű) atom koordinátáit meg lehet határozni. A módszer pontossága tipikusan 1,5-2 Å. Röntgen krisztallográfiával már több ezer fehérjeszerkezetet határoztak meg, amelyek egy nyilvános adatbázisban, az ún. protein adatbankban (Protein Data Bank: www.rcsb.org/pdb/) mindenki számára elérhetőek. Elsőre nehéz elhinni, hogy a kristályosított fehérje szerkezete egyáltalán közelíti a vizes oldatokban felvett szerkezetet. Azonban a fehérje kristályok jelentős mennyiségű (25-90%) vizet tartalmaznak, valamint a kristályosítás során alkalmazott módszerek is a natív szerkezetet stabilizálják, ezért napjainkban a kristályszerkezetet az oldatban

felvett konformáció jó közelítésének fogadják el. Nagyfelbontású NMR vizsgálatokkal az oldatban megvalósuló térszerkezetek is meghatározhatóak, így a fenti kérdés közvetlenül is eldönthető. A fehérjék túlnyomó többségénél - a molekula végén található flexibilis végektől és egyes, a fehérje felszínén levő hurkoktól eltekintve - valóban nem találtak jelentős eltérést a kristályszerkezet ill. az NMR-rel meghatározott struktúra között.

Amennyiben csak a különböző másodlagos szerkezeti elemek relatív arányára vagyunk kíváncsiak, spektroszkópai módszerekhez is fordulhatunk. Ezen a téren a cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia a legismertebb.

Vizsgálataimhoz egy másik spektroszkópai módszert, az infravörös spektroszkópiát választottam, a fehérje másodlagos szerkezetének jellemzésére. A CD spektroszkópia ugyanis nem kombinálható az általam használt speciális technikával, a nagy nyomás alkalmazásával.

2.2. Infravörös spektroszkópia

Infravörös sugárzásnak a 800 nm és 1 mm közötti hullámhosszúságú elektromágneses sugárzást nevezzük. Spektroszkópai szempontból az infravörös sugárzást közeli (NIR), közép (MIR) és távoli (FIR) infravörös tartományokra osztjuk. Ezek hullámhossz tartományai: 800-2500 nm, 2,5-25 μm , 25-1000 μm . Infravörös sugárzással elsősorban a molekulák rezgési és rotációs nívói közti átmenetek gerjeszthetők. Számunkra a középső tartomány lesz a legfontosabb, itt detektálhatók ugyanis azok a rezgések, amelyek a molekulák szerkezetére és konformációjára jellemzőek. A rezgési spektroszkópiában a hullámhossz helyett ennek reciproka, a hullámszám használata terjedt el. A középső infravörös tartomány hullámszámban kifejezve a 4000 cm^{-1} és 400 cm^{-1} közé esik.

2.2.1. Molekularezgések

A legegyszerűbb vibrációra képes molekula a kétatomos molekula, amelynek rezgései egyszerűen leírhatók. A probléma mind klasszikus, mind pedig kvantummechanikai leírásban egzaktul megoldható, ami számos tankönyvben megtalálható, ezért itt részletesen nem tárgyalom (ld. pl. Nagy, 1978). A többatomos

molekulák rezgései is számolhatók, amennyiben a kötésekre jellemző erőállandók, valamint az egyensúlyi koordináták ismertek (Kovács és Szőke 1987). Az infravörös spektrumban gázok esetén a molekulák rotációs vonalai is megjelennek, a munkámban azonban csak folyadékokon (oldatokon) végeztem méréseket, ezért a rotációt nem tárgyalom.

Makromolekulák esetén a rezgések egyenkénti számolása reménytelen próbálkozás lenne. Egy átlagos fehérje, amely kb. 2000 atomot tartalmaz, mintegy 6000 rotációs szabadsági fokkal rendelkezik. Ilyen rendszerek egzakt számolása gyakorlatilag kivitelezhetetlen, főleg, hogy a térszerkezet sem áll rendelkezésre a szükséges pontossággal. Szerencsére azonban az összetett molekulák rezgései között is vannak olyanok, amelyekben gyakorlatilag csak néhány atom vesz részt. Ezeket a néhány atomra ill. néhány belső koordinátára koncentrálódó rezgéseket csoportrezgéseknek nevezzük. Mivel ezekben a vibrációkban a molekula többi atomja nem (vagy csak alig) vesz részt, a csoportrezgések frekvenciája csak kissé függ attól, hogy a rezgő csoport milyen molekulába van beágyazva. Ez a kismértékű eltolódás azonban alkalmas arra, hogy az adott rezgés által információt tudjunk meg a makromolekula konformációjáról, ill. az adott csoport környezetéről. Ilyen csoportrezgésekre biológiai molekulák esetén jó példa a lipidek zsírsavláncainak CH_2 rezgései, valamint a fehérjék konformáció-változásainak detektálására általunk is használt amid rezgések.

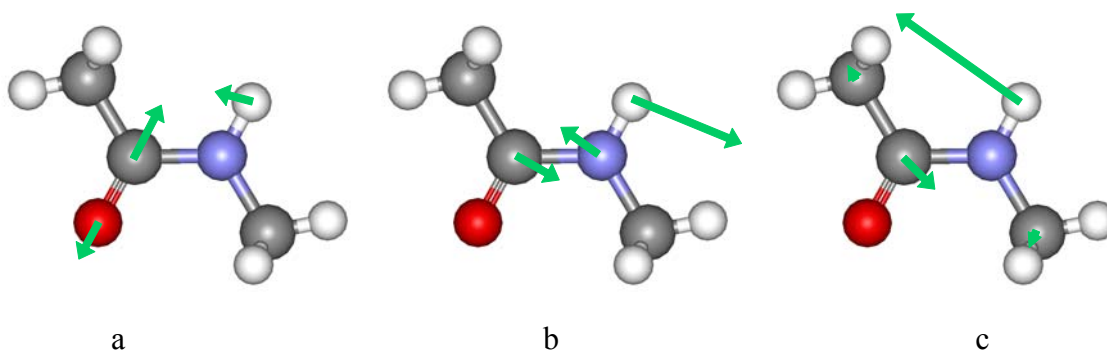
2.2.2. Az N-metilacetamid rezgései

A csoportrezgések, mint említettem, nem nagyon függenek a molekula további részének kémiai felépítésétől, ill. konformációjától. Ezért az egyszerűsített tárgyalás végett a molekula többi részét első közelítésben el is lehet hagyni. Ezt az utat követték Miyazawa és munkatársai (1958), amikor kiszámolták az N-metilacetamid molekula normálrezgéseit, és rámutattak az N-metilacetamid rezgései és a polipeptid lánc gerincének rezgései közti kapcsolatra. Az N-metilacetamid molekula szerkezetét és a számunkra fontos normálrezgéseket a 3. ábra mutatja, a normálrezgések potenciális energiáinak a szimmetriakoordináták szerinti eloszlásai pedig az I. táblázatban vannak feltüntetve. Érdekes megfigyelni, hogy a sajátrezgések a molekula végein található szénatomokat nem (vagy csak nagyon kissé) érintik. Ez

biztosítja, hogy az amid csoportrezgések a fehérjére is átvihetők legyenek, valamint azt, hogy az egyes aminosavak aminocsoportjait (az átmeneti dipól csatolástól eltekintve) független oszcillátoroknak tekinthessük.

Ennek a molekulának a rezgéseit azután (az erőállandók és a geometria finomításával) még több cikkben is újraszámolták. Ezen a téren Krimm és Bandekar (1986) végezték a legalaposabb számolásokat és bebizonyították, hogy az N-metilacetamidra vonatkozó erőállandók átvihetők rövid polipeptidekre és fehérjékre is. A fehérjében minden aminosavhoz egy normálrezgés rendelhető, a polipeptid lánc tehát egy csatolt rezgő rendszer, ahol az átmeneti dipólok egymással kölcsönhatásban vannak. Ez az átmeneti dipól csatolás (Torii és Tasumi, 1992) természetesen függ az egymás közelében levő dipólok orientációjától, azaz végső soron a fehérje másodlagos szerkezetétől.

A gyakorlatban az amid I rezgés bizonyult a leginkább konformáció-érzékenynek. A konformáció-érzékenységet a már említett csatoláson kívül az biztosítja, hogy a rezgés energiájának nagy része (83%) a C=O nyújtási módusból származik*. Ezen oxigén és a fehérje egy másik aminosavjának NH hidrogénje között a konformációtól



3. ábra. Az N-metilacetamid molekula szerkezete valamint a molekula egyes normálrezgései: a) amid I, b): amid II ill. c) amid III (Bandekar (1992) alapján). A zöld nyilak az atomok elmozdulási irányait és azok relatív amplitúdóit szemléltetik, a valódi kitérések az ábrán jelzettnél jóval kisebbek. A színkód ua. mint a 2. ábrán.

* A pontosság kedvéért meg kell jegyezni, hogy ez a C=O kötés tulajdonképpen kismértékben delokalizált a C-N kötés felé (amid kötés), ezért eleve kisebb erőállandójú, mint a szokásos (nem amid kötésben részt vevő) C=O kötések.

I. Táblázat

Az N-metilacetamid molekula amid I-III normálrezgéseinek potenciális energia-eloszlása (Bandekar, 1991 alapján)

Normál módus	hullámszám [cm^{-1}]		potenciális energia-eloszlás
	megfigyelt	számolt	
amid I	1653	1646	CO s (83), CN s (15), CCN d (11)
amid II	1567	1515	NH ib (49), CN s (33), CO ib (12), CC s (12), NC s (9)
amid III	1299	1296	NH ib (52), CC s (18), CN s (14), CO ib (11)

függő hidrogénhíd kötés jön létre (ld. 2. ábra vékony vonalai). A másodlagos szerkezetnek a hidrogénhídon keresztül a C=O rezgésre kifejtett perturbáló hatása a második ok, ami miatt főleg az amid I sáv érzékeny a konformációra.

2.2.3. A fehérjék infravörös spektroszkópiája

A fehérjék infravörös spektroszkópiai vizsgálatainál az egyik leggyakrabban felmerülő probléma a másodlagos szerkezet arányainak meghatározása az infravörös spektrum alapján, azaz annak eldöntése, hogy a fehérjét alkotó aminosavak hány százaléka alkot α -helikális, β -lemezes és egyéb, jól definiált másodlagos szerkezetet. Munkám elkezdésekor a fehérjék konformációjának spektroszkópiai meghatározása éppen kibontakozóban volt. Különböző módszereket dolgoztak ki, amelyek elsősorban az előző részben tárgyalt amid I rezgéseket használták fel a konformáció meghatározásához. Ugyanis, amint már az előző pontban említettem, ez a rezgés bizonyult a leginkább konformáció-érzékenynek.

Itt kell meg említeni, hogy azok az elméleti számolások, amelyek ismert fehérjék röntgenkrisztallográfiával meghatározott térszerkezetéből kiindulva próbálták megadni az amid I sáv alakját, nem vezettek kielégítő eredményre (Tori és Tasumi, 1992), ezért az inverz probléma megoldásával senki sem próbálkozott.

Az amid I sávon alapuló konformációbecslés elterjedését gátolja az a tény, hogy az amid I sáv frekvenciája egybeesik a víz deformációs rezgésével, ami 1645 cm^{-1} -nél nagyon erős abszorpciós sávot ad (Eisenberg és Kauzmann, 1969). Ennek kiküszöbölésére az ilyen vizsgálatok túlnyomó részét nehézvízben végzik, ahol az

izotóp-eltolódás miatt ez a sáv 1215 cm^{-1} -nél lép fel, és így nem zavarja az amid I sávot. A nehésvízben oldott fehérje egyes hidrogénjei, köztük a polipeptid lánc gerincén található nitrogénhez kapcsolódó hidrogén is kicserélődhet a víz deutériumával, azaz deuterált lesz maga a fehérje is. Ennek hatására természetesen az amid sávok is eltolódhatnak. A deuterált fehérje amid sávjait vesszővel szokás megkülönböztetni a normál vízben oldott fehérjéétől. Az eltolódás az amid I sávnál nem jelentős (itt nem is szokták kirakni a vesszőt), de az amid II esetén, ahol a CNH hajlítás dominál, a hidrogén-deutérium kicserélődés okozta eltolódás mintegy 100 cm^{-1} . A kicserélődés jelensége fel is használható arra, hogy a molekula dinamikájáról információt kapjunk. Erről a 2.4.2. fejezetben a T2 tézisponttal kapcsolatban még bővebben is lesz szó.

Mivel egy fehérjében egymás mellett több másodlagos szerkezeti elem is megvalósul, a mért amid I sáv több átlapoló komponens összegeként adódik, melynek megfejtése komplex matematikai módszereket kíván.

A spektrumok matematikai analízise terén két fő irányzat bontakozott ki. Mindegyik módszer család ismert konformációjú referencia fehérjék spektruma alapján próbált matematikai eljárásokat kidolgozni, illetve olyan szabályokat felállítani, amelyek segítségével az ismeretlen konformációjú fehérje másodlagos szerkezete az infravörös spektrum amid I (valamint esetenként az amid II és III) rezgéséből kiszámolható. A referencia fehérjék térszerkezetei az irodalomban közölt röntgendiffrakciós mérések alapján már ismertek voltak.

Az egyik irányzat kidolgozói az ismert másodlagos szerkezetű fehérjékből álló referencia fehérje sorozaton mért infravörös spektrumok faktoranalízisét és többdimenziós lineáris regresszióját használták. Olyan ortogonális saját spektrumokat határoztak meg, amelyek a különböző másodlagos szerkezetekre jellemzőek (Lee és mtsai. 1990). Az ismeretlen fehérje szerkezetét úgy határozták meg, hogy spektrumát ezekből a saját spektrumokból állították elő. Így az alfa, béta és hurok (loop) szerkezetek százalékos arányát sikerült meghatározni.

A másik tudóscsoport azt javasolta, hogy a spektrumot alkotó, egymást átfedő komponenseket először a spektrális felbontóképességet növelő matematikai eljárással kell egymástól elválasztani, majd az így egymástól elváló spektrumvonalak relatív

területaránya alapján lehet a fehérjét felépítő másodlagos szerkezeti elemek arányát meghatározni.

Az utóbbi módszernek a máig leghíresebb művelői Byler és Susi voltak. (Byler és Susi 1986, 1995, Susi és Byler 1986, 1987) Ők az infravörös spektrum átlapoló sávjait a Kauppinen és munkatársai (1981a, 1981b) által bevezetett Fourier öndeconvolúcióval (röviden deconvolúcióval) választották szét.

2.2.4. A Fourier-öndeconvolúció

A deconvolúció célja az, hogy egy széles, struktúra nélküli spektrális sáv komponenseinek vonalszélességét csökkentse, aminek következtében azok elválnak egymástól, és a spektrumban felismerhetők lesznek. A matematikai eljárás azon a feltételezésen alapul, hogy a mért spektrum az alábbi konvolúcióval írható fel (Kauppinen és mtsai, 1981a, 1981b):

$$S(\nu) = L(\nu) \otimes D(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} L(\nu) D(\nu - \nu') d\nu' \quad (1)$$

ahol $L(\nu)$ a vonal alakfüggvénye, $D(\nu)$ az a spektrum, amelyet a homogén és inhomogén kiszélesedés nélkül mérnénk (ν a spektrum független változója, infravörös spektrum esetén a hullámszám). $D(\nu)$ felfogható Dirac-delta függvények

összegeként: $D(\nu) = \sum_{i=1}^n C_i \delta(\nu - \nu_i)$, ahol C_i és ν_i az i -ik komponens amplitúdója, ill.

pozíciója. Az $L(\nu)$ függvény általános esetben a Lorentz-függvénnyel leírható homogén vonalalak és az inhomogén vonalkiszélesedést leíró Gauss-függvény konvolúciója.

A deconvolúció matematikai alapja a konvolúciótétel, ami szerint a Fourier-térben a konvolúció szorzással végezhető el (ld. pl.: Bracewell 1986, Press és mtsai 1990):

$$F(S(\nu)) = F(L(\nu) \otimes D(\nu)) = F(L(\nu)) \cdot F(D(\nu)) \quad (2)$$

Ahol $F()$ a Fourier-transzformációt jelenti:

$$F(S(\nu)) = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\pi i \nu x} S(\nu) d\nu \quad (3)$$

Természetesen az $S(\nu)$ spektrum egy véges tartományban, véges felbontásban áll rendelkezésre, ezért a gyakorlatban diszkrét Fourier-transzformációt alkalmazunk. (Press és mtsai, 1990). A (2) egyenlet alapján a Fourier-térben elvégezhető a konvolúció inverz művelete, aminek eredményeként a mért $S(\nu)$ spektrumból megkaphatjuk az elméleti $D(\nu)$ spektrumot:

$$D(\nu) = F^{-1}\left(\frac{F(S(\nu))}{F(L(\nu))}\right) \quad (4)$$

(ahol $F^{-1}()$ az inverz Fourier-transzformációt jelöli). Ez a spektrum mentes attól a vonalkiszélesedéstől, ami a közeli vonalakat az $S(\nu)$ -ben összemosta. A módszer gyenge pontja, hogy alkalmazásához elvileg ismerni kellene az $L(\nu)$ függvényt. A gyakorlatban elég valamilyen ésszerű feltételezéssel élni a vonalalakot illetően. A módszer jelentős korlátja az is, hogy a valódi, mért spektrumok zajjal terheltek. A dekonvolúció ezt a zajt, különösen annak nagyfrekvenciás komponenseit jelentősen növeli, ami behatárolja a módszer alkalmazhatóságát. Ez azt jelenti, hogy nem lehet kihasználni az elméleti felbontásnövelő hatást, hanem a (3) egyenlettel kapott függvényt simítani kell. Ezt a simítást is a Fourier-térben végzik, egy $A(x)$ ún. apodizációs függvényvel:

$$D'(\nu) = F^{-1}\left(\frac{F(S(\nu))}{F(L(\nu))} \cdot A(x)\right) \quad (5)$$

Az így kapott $D'(\nu)$ függvény ugyan nem Dirac-delták összege, de benne az eredeti spektrumot alkotó vonalak vannak jelen, csak a vonalszélességük kisebb, így az eredetileg átlapoló vonalak egymástól megkülönböztethetővé válnak. Az eljárás alkalmazhatósági hatáiról és a lehetséges veszélyeiről a 4.10. fejezetben a metodikai fejlesztéseknél még részletesen írok. A módszer korlátai ellenére a gyakorlatban az $S(\nu)$ függvény komponenseinek szélességét kb. felére lehet csökkenteni. Az amid I sáv esetén ez elég arra, hogy a sávot alkotó vonalak kirajzolódjanak, és az így kapott görbét már jól lehet illeszteni például olyan Gauss-függvények összegével, amelyek maximumhelyei megadják az átlapoló komponensek pozícióit, a ν_i -ket.

2.2.5. Susi és Byler módszere a fehérje-konformáció meghatározására

Az előző fejezetben részletezett dekonvolúciót és az azt követő görbeillesztést alkalmazta Susi és Byler a fehérje-konformáció meghatározására (Byler és Susi 1986, 1995, Susi és Byler 1986, 1987). A dekonvolvált amid I sávot Gauss-görbékkel illesztették, és a különböző hullámszámhoz tartozó Gauss-komponensekhez különböző másodlagos szerkezeteket rendeltek. A Gauss-komponens görbe alatti területét arányosnak vették az adott másodlagos szerkezetet alkotó aminosavak számával. Így a komponensek területeinek relatív aránya megegyezik a fehérjében előforduló másodlagos szerkezetek arányával. Az egyes komponenseket ismert fehérjék spektruma alapján, az előző fejezetekben részletezett elméleti számolások figyelembevételével rendelték hozzá a másodlagos szerkezeti elemekhez.

Az amid sáv komponenseinek hozzárendelését más szerzők később tovább finomították. A 3_{10} hélixhez a 1662 cm^{-1} hullámszámot rendelték hozzá (Haris és Chapman, 1988). Az amid I sáv két oldalán megjelenő jellegzetes vonalakat pedig a széttekeredett fehérjeszálak közti antiparallel β -szerkezetű kapcsolódással létrejövő aggregátumokkal hozták kapcsolatba (Ismail és mtsai, 1992; Dong, 2000).

Ezek a karakterisztikus hullámszámok a II. táblázatban vannak összefoglalva.

A módszerrel kapcsolatban több kritika is megfogalmazódott. A dekonvolúció valóban „veszélyes” művelet, főleg, ha az eljárást mélyebb megértés nélkül, csak a paraméterek próbálgatása útján használjuk. A másik komoly hibalehetőség a vízgőz vonalainak zavaró hatása. A spektrométerben található levegőben még gondos szárítás után is van nyomokban vízgőz, aminek a spektruma a $1300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ tartományba esik, tehát éppen ráül az amid I sávra. A vékony vízgőz vonalak a dekonvolúció során kiemelődnek, és álcsúcsokat generálhatnak a dekonvolvált spektrumban. Ezért a spektrumfelvételnél nagyon kell ügyelni, hogy a referencia és a minta spektrumok azonos (és minél kisebb) páratartalmú spektrométerben legyenek megmérve. (Az infravörös spektrométerek ugyanis általában egyutasak, azaz a referencia és a minta mérése egymás után történik.) Bár a spektrumra szuperponált vízgőz vonalak különböző spektrumkivonási módszerekkel tovább csökkenthetők, de a legmegbízhatóbb eredményt akkor kapjuk, ha már a mérésnél kizárjuk ill.

minimalizáljuk ezt a hibaforrást. Csak ilyen spektrumok feldolgozása során remélhető megbízható másodlagos szerkezeti becslés.

Bizonytalanságot jelenthet még a spektrum alapvonalának megállapítása, ill. levonása. A legtöbb esetben egyszerűen lineáris alapvonalat használnak, amely az amid I sáv két szélső pontját köti össze. Természetesen az alapvonal levonása is befolyásolhatja az eredményt, de meg kell említeni, hogy Susi és Byler is ilyen alapvonal levonást alkalmazott, és a módszerét így „kalibrálta”, azaz a lineáris háttérlevonás tekintetében a módszer legalább önkonzisztens.

II. Táblázat

Az amid I sáv komponenseinek hozzárendelése a másodlagos szerkezeti elemekhez (¹Byler és Susi (1986), ² Haris és Chapman, 1988, ³ Ismail és mtsai, 1992 alapján)

hullámszám [cm ⁻¹]	másodlagos szerkezet
1616	intermolekuláris béta szerkezet ³
1624-1637	kinyújtott láncok (béta szerkezet) ¹
1645	rendezetlen ¹
1654	alfa hélix ¹
1662	3 ₁₀ helix ²
1663-1670	hajlatok, hurkok ¹
1675	kinyújtott láncok (béta szerkezet) ¹
1683-1694	hajlatok, hurkok ¹
1685	intermolekuláris béta szerkezet ³

A másik fő kérdés az, hogy a Gauss komponensek területe valóban megfeleltethető-e a másodlagos szerkezeti elemek relatív súlyának, azaz a különböző másodlagos szerkezetben levő aminosavak ugyanakkora abszorbanciával rendelkeznek-e? Ez tulajdonképpen nincs elméletileg bizonyítva, de mint legegyszerűbb feltételezést használjuk, annál is inkább, mert a referencia fehérjesorozat másodlagos szerkezete ezzel a feltételezéssel ésszerű hibával megkapható volt.

2.2.6. További módszerek a másodlagos szerkezetnek az infravörös spektrumból való meghatározására

Dousseau és mtsai (1990) felhasználták az amid II sávot is, módszerükkel a referencia fehérjesorozat adataival való jobb illeszkedést érték el. A fehérjéket azonban vizes oldatban mérték, így a víz spektrumának levonása jelentősen bizonytalanná teszi az eljárást.

Venyaminov és mtsai (Venyaminov és Kalnin 1990a, 1990b, Kalnin és mtsai 1990) a módszert a fehérje oldalláncok spektrumának gondos levonásával finomították. Mivel az oldalsávok abszorpciója gyakorlatilag a 1620 cm^{-1} alá esik (Rahmelow és mtsai 1998), ahol nincsenek hozzárendelt másodlagos szerkezeti elemek, ez a levonás nem eredményezi a módszer jelentős javulását.

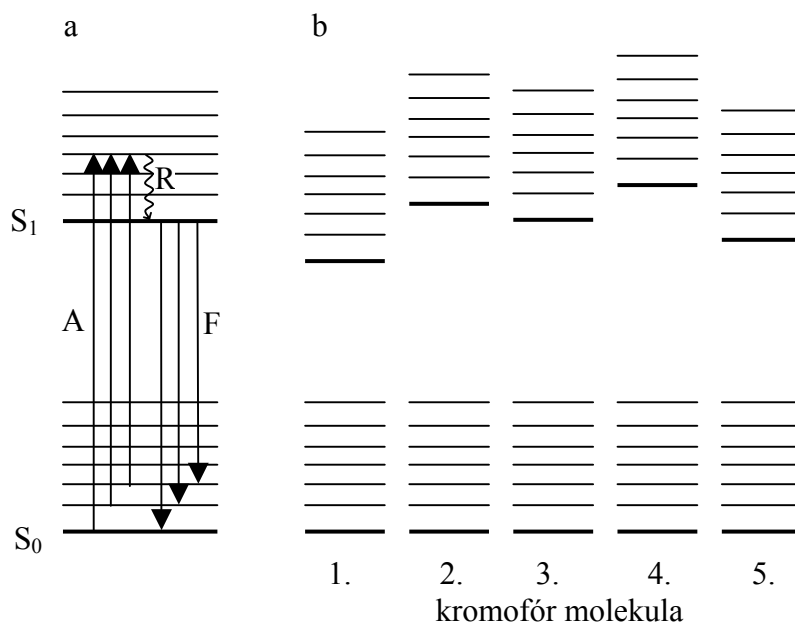
A dekonvolúció helyett gyakran használt módszer még a második derivált meghatározása. (Dong és mtsai, 1990, Taniguchi 1992). Sajnos mind a Gauss-, mind pedig a Lorentz-függvény második deriváltjában a fő negatív csúcs mellett pozitív mellékmaximumok vannak, amelyek a szomszédos komponensek független kiértékelését lehetetlenné teszik. A spektrum második deriváltja ezért csak a másodlagos szerkezet durva becslésére szolgálhat, pl. a fő másodlagos szerkezeti komponens megadására, de illesztésre, vagy a százalékos arányok megadására nem alkalmas. Megjegyzem, hogy a második derivált képzését sokan azért kedvelik, mert ebben a módszerben (látszólag) nincs beállítandó paraméter. Mivel azonban a deriválás is növeli a nagyfrekvenciás zajt, ezért a legtöbb szoftver nem a Fourier-térben való szorzást használja, hanem az ún. Savitzky-Golay módszert (Savitzky és Golay, 1964), ami gyakorlatilag egy simítást foglal magába, aminek már van paramétere, és az eredmény kis mértékben függ is ettől a paramétertől.

2.3. Nagyfelbontású fluoreszcencia spektroszkópai technikák

Röviden szólok még a 4. tézispontban alkalmazott speciális fluoreszcencia spektroszkópai technikákról, a fluoreszcencia vonalkeskenyedésről (Fluorescence Line Narrowing, FLN) és az elméleti leírásban felhasznált spektrális lyukégetésről (Spectral Hole Buning, SHB).

2.3.1. A fluoreszcencia vonalkeskenyedési (FLN) spektroszkópia

Mivel csak a fluoreszcenciával foglalkozunk, elég a Jablonski diagram (Lakowicz 1999) jelentősen egyszerűsített formáját tekintenünk (4.a ábra). Egy kromofór



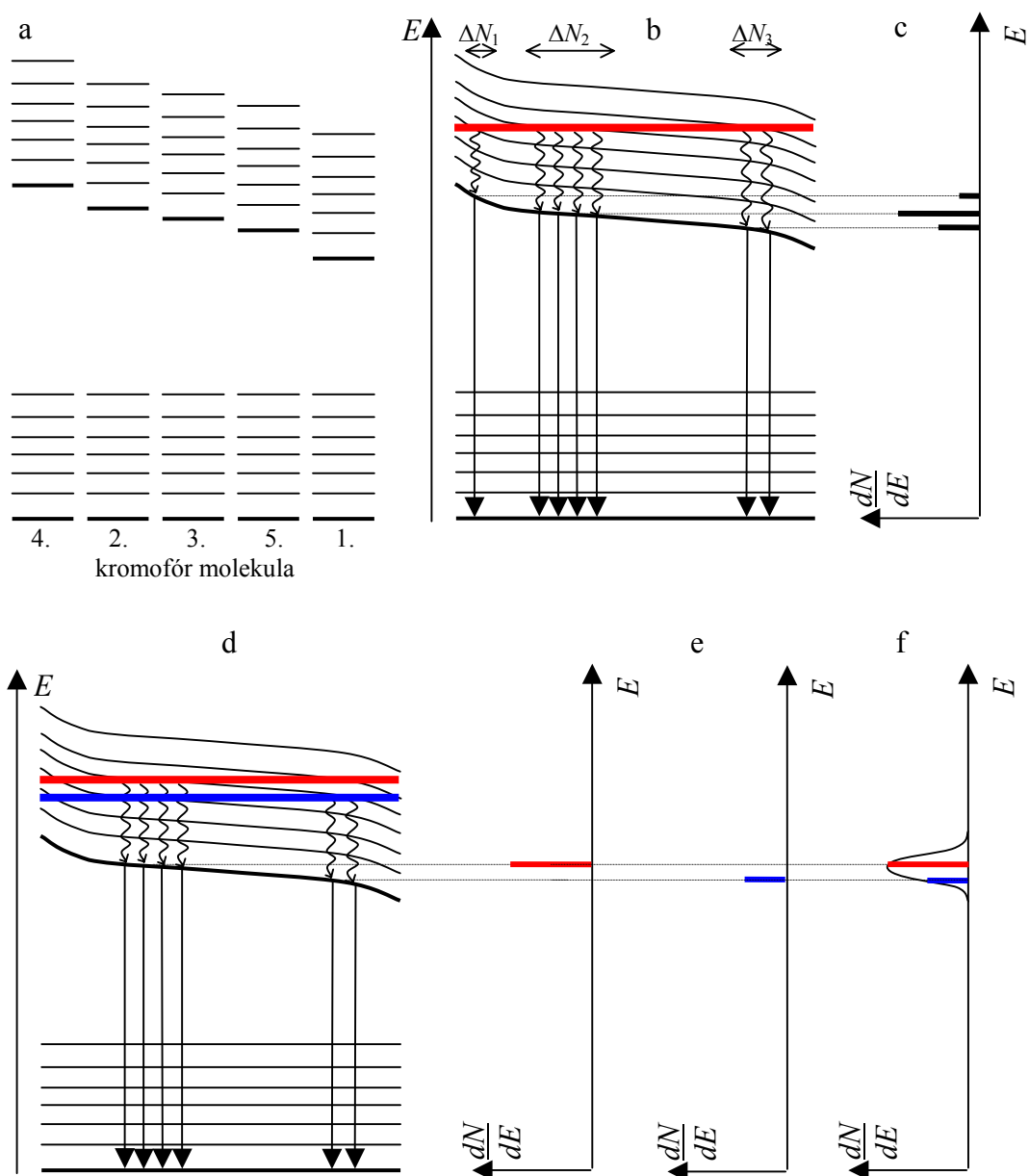
4. ábra. A fluoreszcencia termsémája (egyszerűsített Jablonski diagram). a: A vákuumban lévő kromoforra, néhány lehetséges abszorpció (A) és fluoreszcencia (F) átmenet, valamint a megfelelő vibrációs relaxációk (R) jelölésével. b: Öt, kissé eltérő környezetben levő kromofór termsémája.

molekula elektronjának gerjesztésekor például a 4.a ábrán látható A-val jelölt valamelyik folyamat megy végbe, amely során az elektron magasabb energiájú molekulapályára kerül, és egyúttal megváltozhat a molekula rezgési kvantumszáma is. Ezt a gerjesztést vibronikus (vibronic = vibrational+electronic) gerjesztésnek hívjuk. Ha a gerjesztés megszűnése fluoreszcenciával történik, akkor a sugárzás nélküli vibrációs relaxációt (R) követően például az F-el jelölt folyamatok játszódhatnak le, melynek során foton emittálódik.

Ha a kromofór kölcsönhat a környező atomokkal ill. molekulákkal (összefoglaló néven azzal a mátrixszal, amiben elhelyezkedik), akkor ez általában két módon nyilvánul meg: egyrészt eltolódnak a termek, másrészt az emissziós spektrumban a vibrációs vonalak mellett ún. fonon szárny (fonon wing) jelenik meg a, melynek szélessége néhányszor 10 cm^{-1} -től néhányszor 100 cm^{-1} lehet (Personov és mtsai,

1983). Az eredeti vibrációs vonal (a fononszám változás nélküli átmenethez tartozó ún. zéró fonon vonal) és a fonon szárny intenzitásarányát a Debye-Weller faktor adja meg, mely jelentősen függ a hőmérséklettől (Friedrich és Haarer, 1984). Szobahőmérsékleten a fonon szárnyak uralják a spektrumot és ez az egyik oka annak, hogy a nagyfelbontású spektroszkópiához kriogenikus hőmérséklet (tipikusan 4-10 K) szükséges.

A 4.b ábra inhomogén környezetben elhelyezkedő kromofórok termsémáit mutatja. Bizonyos feltételek mellett, ami az esetek többségében teljesül a vibrációs energiák gyakorlatilag függetlenek (kevésbé függenek) a molekula környezetétől, így a mátrix hatására csak az elektronátmeneti energiák tolódnak el, és ezeket változatlan energiakülönbségekkel követik a vibronikus nívók (Kaposi és Vanderkooi, 1992, Kohler, 1979). A molekulákat az elektronátmeneti energiák szerint sorba rendezve, a molekulák ill. a diagramok számának növelésével egy nagyon szemléletes ábrához, az ún. vibronikus energiatérképhez juthatunk (Kaposi és mtsai, 1992). A vibronikus energiatérkép (5. ábra) segítségével könnyen megérthetjük az FLN spektrumokat, ill. azok információtartalmát. A molekulák vibronikus energiaszintjei az 5. b. ábrán olyan görbéké válnak össze az $N \rightarrow \infty$ limeszben, amelyek mindegyike – az ábrát 90° -al az óramutató járásával egyezően elforgatva – az adott vibronikus energia eloszlásfüggvényét adja. Az 5.f ábrán ennek az eloszlásnak a sűrűségfüggvénye látható az S_1 tisztán elektongerjesztett nívójára vonatkozóan. A gerjesztő frekvenciának megfelelő piros sáv és a vibronikus görbék metszete az 5. b ábrán szemléletesen a gerjesztett kromofórok számát adja (ΔN_1 , ΔN_2 , ΔN_3). A módszert „site-selective” spektroszkópiának is nevezik, éppen azért, mert nem minden kromofórt gerjesztünk, hanem szelektíven csak azokat, amelyekre a környezet hatása olyan, hogy a megvilágító fény fotonenergiájával éppen gerjeszthetők. Látható, hogy a kapott spektrum meglehetősen összetett, még akkor is, ha csak – a vibrációs nem gerjesztett – alapállapotba való visszatéréshez tartozó emissziót vesszük figyelembe (5.c ábra). Az egyszerűség kedvéért itt még azt is feltettük, hogy a különböző vibronikus nívókhoz tartozó abszorpciós együtthatók azonosak.



5. ábra. Vibronikus energiatérkép. a: A környezeti perturbáció hatására megváltozott, az elektronátmeneti energiák szerint sorba rendezett egyszerűsített termsémák (ld. 4.b. ábra), b: A molekulák számának növelésével kapott vibronikus energiatérkép, c: Monokromatikus gerjesztés hatására létrejövő felbontott spektrum. d: Egy vibronikus nívó gerjesztése különböző energiákkal. e: Egy vibronikus nívó gerjesztését követő emissziós csúcsok két különböző gerjesztési energia esetén. f: A környezet perturbáló hatását leíró eloszlás sűrűségfüggvénye, az inhomogén eloszlásfüggvény (Kaposi és Vanderkooi 1992 alapján)

Ha egyetlen emissziós vonalra koncentrálunk, (azaz egy adott vibronikus görbe gerjesztése utáni emissziót tekintjük, mint az 5.d ábrán) rögtön láthatjuk a technikából nyerhető legfontosabb információt: a gerjesztő energia adott változtatásának hatására

az emissziós vonal (5.e ábrák) ugyanannyival eltolódik, intenzitása pedig a dN/dE sűrűségfüggvény szerint változik (5.f ábra). Ez a függvény írja le a környezet által okozott perturbációt, neve inhomogén eloszlás (disztribúció) függvény (IDF) ill. populáció disztribúció függvény (PDF) (Kaposi és Vanderkooi, 1992). A gyakorlatban a gerjesztő energia változtatásával több feloldott spektrumvonal intenzitásváltozását követjük végig, és erre illesztünk egy Gauss-görbének vagy azok összegének feltételezett IDF-et. Az illesztés megadja még a különböző vibronikus vonalakhoz tartozó abszorpciós együtttható arányokat is, de biológiai mintában a kromofór környezetének jellemzésére magát az IDF-et használjuk.

2.3.2. A spektrális lyukégetés technika (SHB)

Mivel elsőként végeztem nyomásváltoztatással kombinált FLN méréseket, a változó nyomás hatását leíró elméletet – a spektrális lyukégetésre (Spectral Hole Buning, SHB) már ismert elmélet továbbfejlesztéseként – nekem kellett kidolgoznom (ld. 4. tézispont). Ezért röviden bemutatom az SHB technikát is. Ebben a kísérletben egymástól izolált, szerves mátrixban vagy fehérjében elhelyezkedő kromofórok környezetének kompresszibilitását lehetett megmérni kriogenikus hőmérsékleten. A spektrális lyukégetés lényege, hogy egy nagyon kis vonalszélességű ($< \text{GHz}$) lézerrel megvilágítjuk a mintát, ami a megvilágító frekvenciánál „kiég” azaz fotokémiai vagy fotofizikai átalakuláson megy át, és ebben a tartományban a továbbiakban már nem abszorbeál. Így az abszorpciós spektrumban egy éles minimum („lyuk”) keletkezik. A módszer előnye, hogy ennek a keskeny spektrális markernek a segítségével nagyon kis spektrális eltolódások is nyomon követhetők, így ezekben a mérésekben elegendő volt néhány MPa nyomásváltozást alkalmazni.

A kompresszibilitás spektroszkópai mérésére Laird és Skinner (1989) a spektrális lyukégetés kísérletek értelmezésére kifejlesztett elméletét használták.

2.3.3. A Laird-Skinner elmélet: a kompresszibilitás meghatározása SHB spektroszkópia segítségével

Laird és Skinner elmélete a következőkben foglalható röviden össze. Egy kiválasztott kromofór átmeneti frekvenciája egy tőle R távolságban levő, a környezethez (mátrix)

tartozó molekula hatására $\nu(R)$ -el változik meg a vákuumhoz tartozó ν_{vac} átmeneti frekvenciához képest. Ez a változás nyomás hatására tovább fokozódik, $(\nu'(R,p))$ mivel az eredetileg R távolságra levő környezeti molekula közelebb kerülén nagyobb hatást gyakorol a kromoforra. Ha a hatás kicsi, a $\nu'(R,p)$ függvény p -ben lineáris:

$$\nu'(R,p) = \nu(R) + \alpha(R) p \quad (6)$$

ha az összenyomást izotrópnak és homogénnek tételezzük fel, akkor $\alpha(R)$ -re a következő kifejezést kapjuk:

$$\alpha(R) = -\frac{R}{3} \frac{\partial \nu(R)}{\partial R} \kappa \quad (7)$$

ahol $\kappa = -\frac{1}{V} \frac{\partial V}{\partial p} \Big|_T$ az izotermikus kompresszibilitás. Feltételezve, hogy a kromofór

és a környezet kölcsönhatására a Lennard Jones-potenciál távoli, vonzó tagja jellemző, amely R^{-6} -al arányos, akkor:

$$\nu(R) = -\frac{c}{R^6} \quad (8)$$

ahol c egy pozitív konstans. Ezt felhasználva:

$$\nu'(R,p) = \nu(R) (1+2\kappa p) \quad (9)$$

Ha a spektrális lyukat $p = 0$ nyomáson ν_0 frekvenciánál égettük, és az a p nyomáson mérve ν_p értékhez tolódik el, akkor

$$\nu_0 - \nu_{vac} = \sum_{i=1}^N \nu(R_i), \text{ valamint } \nu_p - \nu_{vac} = \sum_{i=1}^N \nu'(R_i), \quad (10)$$

ahol N az összes a környezetben levő, a kromofórral kölcsönhatásban levő molekula száma. Természetesen ez elméletileg végtelen, mert az R^{-6} függvény a végtelenben éri el a 0-t de a gyakorlati felhasználás szempontjából elég egy véges környezetet tekinteni. Lesch és mtsai (2004) arra a következtetésre jutottak, hogy a figyelembe veendő hatásos környezet nagyjából a fehérjék tipikus méretével (néhány nanométer) egyezik meg.

A fentiek alapján egy kromofór molekula spektrális vonalának eltolódása, azaz a spektrális lyuk eltolódása a következőképpen adható meg:

$$\nu_p - \nu_0 = 2 (\nu_0 - \nu_{\text{vac}}) \kappa p. \quad (11)$$

A $(\nu_p - \nu_0)/2p$ mennyiséget az égetési frekvencia (ν_0) függvényében ábrázolva egyenest kapunk, aminek meredeksége a kompresszibilitás, az ordinátával való metszetéből pedig a vákuumfrekvencia is meghatározható.

2.4. A nagy nyomás

A nyomás, mint fizikai paraméter, a bevezetőben már említett okok miatt jelentősen kisebb figyelmet kapott a kutatásokban, mint a vele egyenrangú másik termodinamikai mennyiség, a hőmérséklet. A nyomásperturbáció alkalmazásának egyik úttörője Percy Williams Bridgman volt, aki a nagy nyomáson végzett méréseiért 1946-ban Nobel-díjat kapott. Nagy nyomás alatt ma a fizikában általában a 100 MPa-t (=1 kbar-t, azaz a légnyomás 1000-szeresét) meghaladó nyomásokat értik. Speciális (és drága) technikákkal ma már néhány 100 GPa is elérhető, a számomra érdekes tartomány azonban kb. 1 GPa-ig terjed, mivel ekkora nyomáson a fehérjékben már lezajlanak azok a strukturális változások, amelyeket tanulmányozni szerettem volna. Ennél nagyobb nyomáson a víz és a nehézvíz is megfagy már szobahőmérsékleten (Bridgman 1911, 1935), így a vizes oldatban levő fehérje sem vizsgálható eredeti környezetben.

2.4.1 Nagy nyomás hatása kémiai folyamatokra és azok egyensúlyára

A nyomás hatása legegyszerűbben kétállapotú rendszereken mutatható be. A nyomás hatására az ilyen rendszerek a Le Chatelier-Braun elvet követve igyekeznek a kisebb térfogatú állapotukat felvenni. Vegyünk egy egyensúlyra vezető reakciót, amely a K egyensúlyi állandóval jellemezhető. Ekkor:

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial p} \right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T = \Delta V, \quad (12)$$

ahol ΔV a rendszer térfogatának változása a reakció során egy mól anyagra vonatkoztatva. Ha ΔV pozitív, akkor a termék nagyobb térfogatú, mint a kiindulási

agyag, és ebben az esetben a $\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T$ negatív, azaz a nyomás növelésével az $\ln K$ és maga a K is csökken, vagyis az egyensúly a kevesebb termék irányába mozdul el. Ha ΔV nyomástól való függése elhanyagolható, akkor:

$$\ln K = -\frac{p\Delta V}{RT} + konst. \quad (13)$$

A biológiai rendszerekben végbemenő enzimatis reakciók esetén a reakció során gyakran található egy ún. aktivált állapot (azaz egy energia-gát) amelyen a reakció folyamán áthaladunk. Ennek a kezdeti állapothoz viszonyított energiája az aktivációs energia ($E^\#$). Hasonló módon definiálhatjuk az aktivációs térfogatot ($V^\#$) is, ami a kezdeti állapothoz viszonyított térfogatváltozás.

Így a (13) egyenlethez hasonló összefüggés írható fel reakciósebesség és az aktivációs térfogat között:

$$\ln\left(\frac{k}{k_0}\right) = -\frac{p\Delta V^\#}{RT} + konst. \quad (14)$$

ahol k ill. k_0 a *kiindulási állapot* \rightarrow *átmeneti komplex* folyamat sebességi állandója p ill. p_0 nyomáson.

Az $\ln K$ -t, ill. az $\ln k$ -t állandó hőmérsékleten a nyomás függvényében ábrázolva a meredekségből megkaphatjuk a reakció során fellépő térfogatváltozást, ill. az aktivációs térfogatot. Ez utóbbi ábra az Arrhenius ábrázolással analóg, azzal a különbséggel, hogy az aktivációs energia mindig pozitív, az aktivációs térfogat pedig akár negatív is lehet, ilyenkor a nyomás növekedése gyorsítja a reakciót.

2.4.2. Nagy nyomás hatása fehérjékre

Fehérjék esetén kétfajta folyamatot kell szemügyre vennünk, amelyeknek a nyomásfüggése érdekes lehet. Az egyik csoportba a fehérje, vagy fehérje-aggregátumok olyan konformáció-változása tartozik, amelynek során a rendszer össztérfogata megváltozik. A fehérjét mindig vizes oldatban tanulmányoztam, így a rendszer térfogatváltozása vagy a fehérjének magának vagy fehérje és a víz kölcsönhatásának megváltozása során jöhetett létre. (Olyan folyamatok, ahol csak a

víz állapota változik, számomra nem voltak érdekesek, hiszen a fehérjéről szerettem volna információt kapni.) A fehérjék denaturációja, azaz a polipeptidlánc széttékeredése során a szerkezetet stabilizáló hidrogénhid kötések felszakadnak, helyettük fehérje-víz hidrogénhidak jönnek létre. A fehérje kevésbé kompakt szerkezetet vesz fel, aminek következtében annak „felülete” megnő, azaz a fehérje-víz kölcsönhatás a fehérje alkotórészek (azaz aminosavak) egymás közti kölcsönhatásának rovására növekszik. Kísérleti eredmények mutatják, hogy számos fehérje denaturálható néhány száz MPa nyomáson (Bridgman, 1915; Hawley 1971, Zipp és Kauzmann, 1973, Heremans, 1982, Taniguchi és Suzuki, 1983). A denaturációs nyomás természetesen fehérjéről fehérjére változik, de a kémiai környezettől (pl. pH) is függ.

Fehérje-asszociátumok oldata esetén figyelembe kell venni a fehérjék közti kölcsönhatásokat is. Így az intermolekuláris fehérje-fehérje kölcsönhatás is feliratkozik az egymással vetélkedő kölcsönhatások listájára. Tapasztalatok szerint a fehérje-aggregátumok, oligomerek túlnyomó többsége már a tipikus denaturációs nyomásnál kisebb nyomásokon disszociálódik (Silva és Weber 1988, 1993, Silva és mtsai 2001).

A fehérjékhez köthető másik típusú folyamat, amelynek nagy nyomás alatti tanulmányozása érdekes lehet: maga az enzimműködés. Tehát annak a kémiai folyamatnak a tanulmányozása, amelyet a fehérje katalizál. Ebben az esetben a reakció aktivációs térfogatát és reakció-térfogatát kapjuk meg a nyomás függvényében végzett mérések és az előző fejezetben említett termodinamikai összefüggések felhasználásával. Ehhez az egyensúlyi reakcióállandót, ill. a folyamat kinetikáját kell mérnünk a nyomás függvényében. Az aktivációs, ill. reakció-térfogat útmutatást adhat a reakció mechanizmusát illetően (ld. pl. Fanke és mtsai 2007).

2.4.3. A fehérjék Hawley-féle elliptikus nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja

Amint már említettem a fehérjék nemcsak magas hőmérsékleten, hanem nagy nyomáson is denaturálódnak. Sőt a Privalov által leírt hideg-denaturáció jelensége tovább bonyolította a helyzetet. Mindhárom denaturációra magyarázatot ad a Hawley által fenomenológiai termodinamikai leírással bevezetett elliptikus fázisdiagram

(Hawley, 1971). Az elliptikus diagram két fehérjeállapotot feltételez, a natív és a denaturált szerkezetet. Hawley a denaturáció szabadentalpia változását:

$$\Delta G = G_{\text{denaturált}} - G_{\text{natív}} \quad (15)$$

számolta ki. Egy (tetszés szerint választható) T_0 , p_0 referencia pontból kiindulva integrálta ki a $d(\Delta G) = -\Delta S dt + \Delta V dp$ kifejezést, ami a következő eredményre vezetett:

$$\Delta G = \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) - \Delta C_p \left[T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \right] + \Delta V_0(p - p_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0 \quad (16)$$

ahol: $\beta = (\partial V / \partial p)_T$ az ún. kompresszibilitási faktor, $\alpha = (\partial V / \partial T)_p = -(\partial S / \partial p)_T$ a hőtágulási együttható, $C_p = T(\partial S / \partial T)_p$ pedig az állandó nyomáson mért fajhő. A Δ mindig az utána következő fizikai mennyiség (ugyanolyan p és T melletti) denaturált és a natív állapotbeli értékeinek különbségét jelöli.

Ez a T_0 -hoz közeli T értékekre érvényes

$$T \left(\ln \frac{T}{T_0} - 1 \right) + T_0 \approx \frac{(T - T_0)^2}{2T_0} \quad (17)$$

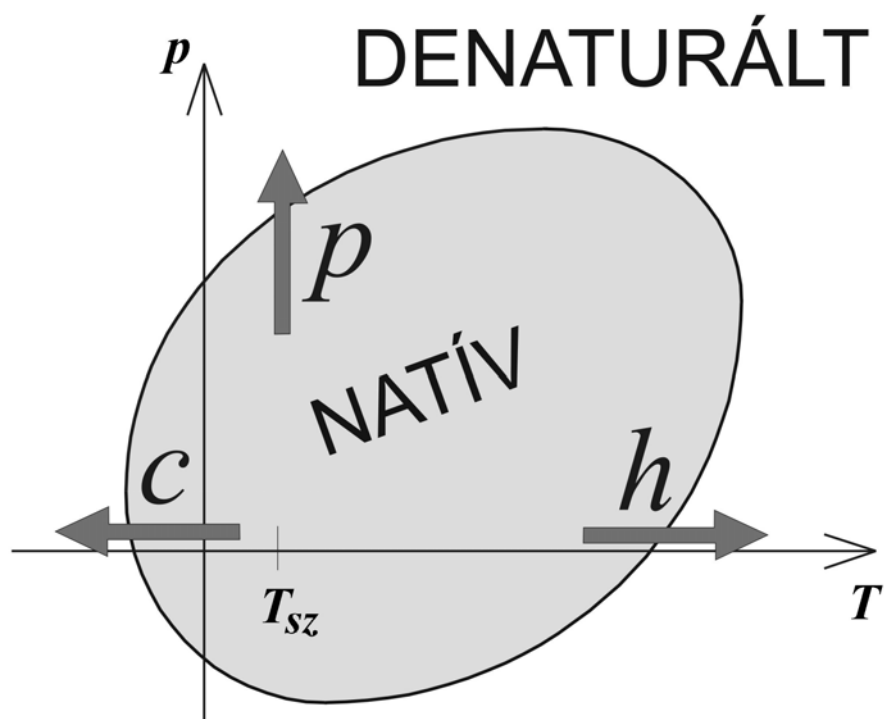
közelítés után ugyanazt a kifejezést adja, mintha a ΔG -t a nyomás és a hőmérséklet függvényében, a másodrendű tagokkal bezárólag sorbafejtenénk:

$$\Delta G = \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0 \quad (18)$$

A natív \leftrightarrow denaturált állapot közti fázisátalakulás középpontjában $\Delta G = 0$. Amennyiben:

$$\Delta\alpha^2 > \Delta C_p \Delta\beta / T_0, \quad (19)$$

akkor a $\Delta G = 0$ pontok egy elliptikus görbét adnak (6. ábra). A görbén belül a fehérje natív, míg azon kívül denaturált állapotban van. Ezt a görbét Hawley kísérletileg is kimérte két fehérjére, a kimotripszinogén és a ribonukleáz esetén. A dolog szépséghibája, hogy kísérleti berendezésével nem tudott elég nagy nyomást elérni, és így pH2-nél végezte a méréseket, azaz a pH-val mintegy elő-destabilizálta a fehérjét. Így az ellipszis hideg vége sem nyúlt a fagyponthoz alatti tartományba, azaz 0°C alá.



6. ábra. A Hawley-féle elliptikus fázisdiagram sematikus ábrázolása. (A c , p , h betűk a hideg, nyomás és hődenaturációt jelentik, T_{sz} a szobahőmérséklet).

Bár az elmélet által jósolthoz hasonló görbét már több fehérjére is kimérték, nem szabad említés nélkül hagynunk a leírás hiányosságait sem. Például az a feltételezés, hogy a denaturáció reverzibilis, és hogy a többféle úton denaturált fehérjék ugyanabba a (denaturált) állapotba jutnak, drasztikus egyszerűsítés, amely még a hétköznapi tapasztalatoknak is ellentmond. (pl. a tojásfőzés sem reverzibilis folyamat!) Ugyanakkor a modell semmit sem mond a denaturáció mechanizmusáról. A pusztán fenomenológiai modellből teljesen hiányoznak a fehérjére jellemző sajátosságok, azaz ha a termodinamikai paraméterek hasonlóak, akármilyen molekuláris felépítésű rendszert le lehet vele írni. Valóban, hasonló elliptikus fázisdiagramokat kaptak folyadékkristályos rendszerek esetén, (Clark 1979, Klug és Whalley 1979), valamint egyes polimerek oldatainál (Kunugi és mtsai 1997), sőt a keményítő fázisdiagramjánál is megfigyeltek elliptikus fázishatárokat (Rubens és Heremans, 2000).) A fázisdiagram továbbfejlesztéséről még a T3, T5 és T7 tézispontokban részletesen lesz szó.

2.5. A vizsgált problémák irodalmi háttére, problémafelvetések és célkitűzések

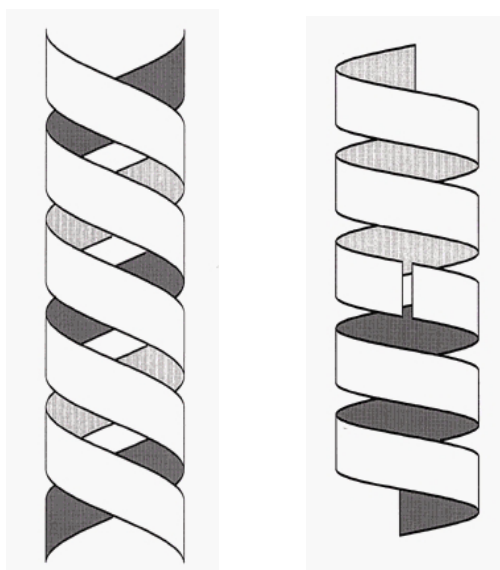
2.5.1. A fehérje-konformáció nagy nyomás hatására történő változásainak infravörös spektroszkópiai jellemzése (T1[†])

A munka elkezdésekor a fehérjék nagy nyomáson történő konformáció-változásait még nem lehetett egzakt módon mérni. Léteztek ugyan módszerek a fehérje-denaturáció nagy nyomás alatti mérésére, (ezek főleg fluoreszcens és UV abszorpciós spektroszkópiai technikák voltak) (Balny és mtsai, 1992), amelyek azonban a proteinek másodlagos szerkezetéről nem szolgáltatott adatokat. Ekkor kezdtem foglalkozni (Leuvenben prof. K. Heremans laboratóriumában) a fehérjék nagy nyomású infravörös spektroszkópiájával. Célunk az volt, hogy az infravörös technika segítségével az ún. nagy nyomású gyémánt cellában (Sherman és Stadtmüller, 1987) nagy nyomás alatt („in situ”) végezzünk fehérje-konformáció meghatározást. Elsősorban az infravörös spektrum amid I sávját használtuk fel a fehérje-konformáció meghatározásához, ami az előző fejezetekben elmondottak szerint komplex matematikai kiértékelést kíván.

Mivel nagy nyomás alatt ilyen mérések eddig nem születtek, így az adatok analíziséhez megfelelő módszert kellett keresnünk, ill. kidolgoznunk. A nyomás alatti *in situ* konformáció-meghatározást nehezítette, hogy az egyes másodlagos szerkezetekre jellemző spektrális komponensek a nyomás direkt fizikai hatása miatt várhatóan eltolódnak, akkor is, ha konformációs változás nem következik be a fehérjében. Módszerünknek ezt az effektust is figyelembe kellett vennie.

A módszert egy antibiotikumként használt polipeptidre, a *gramicidin A*-ra alkalmaztuk először. Ennek egyik sajátossága, hogy L és D aminosavakból, felváltva épül fel (Wallace, 1986), aminek következtében különleges szerkezeteket vehet fel. A lipidmembránba épülve két molekula kapcsolódik össze, ezek vagy egymásba ágyazódó szerkezetű kettős hélixet ($\beta^{5.6}$), vagy két külön hélixből ($\beta^{6.3}$) felépülő dimert alkotnak (7. ábra), (Wallace, 1998, Killian, 1992). Ez utóbbi közepén csatorna képződik, amely elég széles ahhoz, hogy rajta keresztül iontranszport induljon meg. Ezen alapul a gramicidin antibiotikus hatása. A gramicidin sajátos szerkezetei miatt

[†] (Tn) azt jelenti, hogy a fejezet az n.-ik tézispont eredményeihez kapcsolódik.



7. ábra. A gramicidin A antibiotikum két szerkezete: a) dupla hélix, b) csatorna

természetesen a Susi és Byler-féle másodlagos szerkezeti hozzárendeléseket itt nem használhattuk.

A másik fehérje, amely esetén a módszert alkalmaztuk, a marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (BPTI) nevű fehérje volt. A téma aktualitását az adta, hogy a molekuláris dinamikai számolás technikája (pontosabban a hozzá használt számítógépek teljesítménye) akkortájt jutott el arra a szintre, hogy egy ilyen viszonylag kicsi (58 aminosavat tartalmazó) fehérjén a konformáció nyomástól való

függését teszteljük. Természetesen az akkori számítógépekkel csak nagyon rövid ideig lehetett nyomon követni a fehérje-konformáció változásait. Kitchen és mtsai (1992), ill. Brunne és Gunsteren (1993) 100 ps ill. 500 ps hosszan követték molekuladinamikai számolásaikkal a molekulászerkezet változásait. Egyik számolásban sem kaptak nyomás-denaturációra utaló jelet. Ezt megerősítette fluoreszcencia spektroszkópiai mérésük, mely szerint a tirozin fluoreszcenciájának az intenzitása változatlan egészen 1GPa nyomásig. Eredményeik abból a szempontból szokatlanok voltak, hogy a fehérjék „tipikus” denaturációs nyomása a 0,4 GPa - 0,8 GPa tartományban van (Weber és Drickamer, 1983). A szokatlan stabilitást a molekulában található három diszulfid hiddal magyarázták. Azonban felvetődött a kérdés, hogy a molekuladinamikai számolások nagyon rövid ideje alatt várható-e egyáltalán globális konformáció-változás? Valószínűnek látszott, hogy a molekuladinamikai számolások azért sem adhattak konformáció-változást, mivel túl rövid ideig követték a fehérjeszerkezet változásait. Az egyetlen kísérleti bizonyíték a tirozin fluoreszcencia-intenzitásának állandósága volt, ami azonban csak közvetett bizonyítéknak tekinthető. Az akkor újdonságnak számító kísérleti technika, a nagy nyomású FTIR spektroszkópia segítségével azt szerettük volna eldönteni, hogy

valóban nincsenek-e konformáció-változások a BPTI-ben, valóban nem lehet-e nyomással denaturálni a 0-1 GPa nyomástartományban, vagy csak a számolások időskálája volt túl rövid, hogy ezeket a jelenségeket detektálják.

2.5.2. A hidrogén/deutérium kicserélődés és a konformációs változások egymásra hatása (T2)

Mint már említettem, a fehérjék konformációjának meghatározására irányuló infravörös spektroszkópai méréseket nehézvízben kell végezni, a víz deformációs rezgése által okozott zavaró hatás elkerülése végett. Nehézvízben a fehérje nitrogénhez és oxigénhez kapcsolódó hidrogénjei, — köztük a fehérje gerincét alkotó nitrogénekhez kapcsolt hidrogének is, —kicserélődhetnek a nehézvíz deutériumaival. A folyamat sebességét az is befolyásolja, hogy mennyire érhető el az adott hidrogén a nehézvíz molekulák ill. a deutérium ionok számára. Ezt felhasználva Englander (1984) dolgozott ki módszert a fehérjeszerkezet flexibilitásának a hidrogén-deutérium kicserélődés segítségével történő vizsgálatára. Mi más megközelítést választottunk, mert minket nem a kicserélődés dinamikája érdekelt, hanem a kicserélődés és a nagy nyomással okozott konformáció-változás közti összefüggés. A fehérjék nagy nyomás alatt mért infravörös spektrumainak értelmezésében nehézséget jelentett, hogy a két folyamat kombinálódott, mindegyikük befolyásolta a konformációra jellemző amid I sáv alakját. A kicserélődési folyamat elkülönítve is nyomon követhető az amid II és II' sávok segítségével. Azt vártuk, hogy az amid I sávnak a kicserélődésből eredő spektrális változásai korrelálnak az amid II és II' sávbeli változásaival. A korreláció vizsgálatára a Noda által akkoriban kifejlesztett kétdimenziós (2D) korrelációs infravörös spektroszkópia látszott jó módszernek (Noda 1990). Ezt az eljárást részletesen a módszereknél a 3.3 fejezetben írom le. A 2D spektroszkópai kiértékeléssel arra kerestünk választ, hogy a konformációs effektusok és a hidrogén-deutérium kicserélődés milyen kapcsolatban állnak egymással. A két folyamat kölcsönhatását két fehérjén vizsgáltuk, az egyikben csak elasztikus, a másikban pedig konformációs szerkezetátalakulások is várhatók voltak. Célunk az volt, hogy a fehérje konformációs, elasztikus és H/D kicserélődési folyamatait elkülönítsük, és ezeknek a folyamatoknak a végbemenetelét és kölcsönhatását a nyomás függvényében kövessük.

2.5.3. A fehérje felgombolyodás (folding) és a misfolding: intermediér állapotok keltése nagy nyomással. (T3, T7)

A fehérje gombolyodásának (folding) problémája, azaz annak tanulmányozása, hogy a frissen szintetizált polipeptid lánc hogyan jut el abba a háromdimenziós szerkezetbe, ami biztosítja a biológiai rendszerben neki szánt funkció teljesítését, akkor vált izgalmas kérdéssé amikor Levinthal (1968) megmutatta, hogy ez a folyamat, amennyiben véletlenszerűen történne, hosszabb időt venne igénybe, mint az univerzum életkora. Az irányított felgombolyodást talán a legszemléletesebben az ún. tölcsér modell magyarázza el (Pain 2001). A kutatás új lendületet kapott, amikor kiderült, hogy bizonyos konformációs betegségekből félrelépő felgombolyodott fehérjék vízben oldhatatlan aggregátumai rakódnak le a szövetekben (Kelly, 1997, Fink, 1998, Booth és mtsai 1997).

Az irodalomban publikált felgombolyodási (folding) vizsgálatok valójában az újragombolyodást (refoldingot) tanulmányozták. A fehérje-felgombolyodás kísérleti tanulmányozására használt általános módszer a kémiai ágensekkel való denaturáció és az ezt követő hirtelen kihígítás, aminek következményeként a denaturáló kémiai ágens koncentrációja a kritikus alá csökken, így megindul a felgombolyodás (ún. stopped flow módszer (Eaton és mtsai 2000)). A nyomás-denaturáció olyan új eszközt kínált, amivel a kémiai ágens kiválthattuk. A nyomás alkalmazásának előnye az is, hogy míg a kémiai ágens a kihígítás során nem eliminálható tökéletesen a rendszerből, a nyomás teljesen megszüntethető. Egyik célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, valóban helyettesíthető-e a korábbi módszer a nyomás-denaturációval és az azt követő hirtelen nyomáscsökkentéssel.

A fehérje-felgombolyodási vizsgálatok egyik fontos kérdése a feltekeredési útvonalon létrejövő köztes állapotok létezése volt. Számos kísérletet ill. modellszámolást végeztek ugyanis annak bizonyítására, hogy a fehérjék feltekeredésük során köztes (intermediér) állapotokon mehetnek keresztül (Matagne és mtsai, 1997, Dobson, 2001). A fehérjék klasszikus (Hawley féle) elliptikus fázisdiagramja ilyeneket természetesen nem tartalmazott, hiszen még a hő és nyomásdenaturált állapotok különbözőségét sem tudta leírni. (Hawley, 1971). Ugyancsak hiányoznak belőle a fehérje-fehérje kölcsönhatások is, holott ezek biológiai relevanciája nyilvánvaló.

A Hawley elméletnek egy további gyengéje, hogy a szabadenergia hőmérséklet és nyomás szerinti kifejtésében a négyzetes tagoknál magasabb rendűeket már nem vesz figyelembe, ami fizikailag annak felel meg, hogy a denaturációkor bekövetkező kompresszibilitás- fajhő- és hőtágulási együttható-változás független a hőmérséklettől és a nyomástól.

Így azt a kérdést tettük fel, hogy hogyan módosul a Hawley-elmélet által jósolt elliptikus diagram, ha a harmadrendű tagokat is figyelembe vesszük.

További kérdés volt, hogy a denaturált fázisban vannak-e fázishatárok, azaz a különböző úton denaturált fehérjeszerkezetek azonosak-e? Tisztázni akartuk az intermedier konformációk szerepét és helyzetét a fázisdiagramon, ezek létrejöttét a polipeptidlánc széthajtogatódása ill. felgombolyodása során, valamint az intermedier konformációban levő fehérjék aggregációra való hajlamát. A fázisdiagramot ki akartuk egészíteni olyan módon, hogy az ne csak egy izolált fehérjére vonatkozzon, hanem a biológiai rendszerekben jelen levő fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is figyelembe véve a fázisdiagram tartalmazza az aggregált fázisokat is.

2.5.4. A fehérje dinamikájának jellemzése kompresszibilitás-méréssel. (T4)

A fehérjék enzimműködésének egyik elengedhetetlen feltétele a térszerkezet dinamikus fluktuációja. Molekuladinamikai számolásokkal bizonyították, hogy a mioglobin hem csoportjához nem is tudna az oxigén bejutni, ha a röntgenkrisztallográfiával meghatározott szerkezet állandó maradna (Karplus és Petsko, 1990). A fehérjeszerkezet flexibilitását a térfogati fluktuációval lehet jellemezni. A fluktuáció-disszipáció tétel szerint (ld. pl. Antal, 1980):

$$\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2 = kTV\kappa_T \quad (20)$$

Ahol κ_T az izoterm kompresszibilitás. A fluktuáció-disszipáció tételen keresztül tehát a fehérje flexibilitása, dinamikája szoros kapcsolatban van a kompresszibilitással (Cooper, 1976).

A fehérje kompresszibilitásának mérése technikailag nagyon nehéz feladat. Két, egymástól merőben eltérő elvekre épülő módszer létezett az irodalomban. Az egyik eljárás az ultrahang sebességének mérésén alapul (Gekko, 1991, Tamura és Gekko,

1995). Hátránya az, hogy nem közvetlenül a fehérje kompresszibilitását méri, hanem az egész fehérjeoldatot, amit az oldószerre korrigálni kell. Ráadásul az adiabatikus és nem az izotermális kompresszibilitást szolgáltatja, az izoterm kompresszibilitás számolásához még további termodinamikai jellemzők (hőtágulási együttható és fajhő) figyelembe vétele szükséges.

Ha a fehérje tartalmaz olyan prosztetikus csoportot, amely lumineszkál, egy másik módszer is használható. Ez a spektrális lyukégetés (hole burning), amely direkt spektroszkópiai úton detektálja az összenyomáskor eltolódó atomcsoportok által a kromoforra kifejtett hatást, amiből a kompresszibilitás számolható (Zollfrank és mtsai 1991). A módszer hátránya az, hogy 4K hőmérsékleten kell végezni, valamint az, hogy a kísérlet elvégzéséhez különleges (és drága), nagyon kis spektrális vonalszélességű, hangolható lézerre van hozzá szükség.

Ezért olyan módszert kívántunk kifejleszteni, amellyel a rendelkezésre álló (az említett extrém paraméterekkel nem rendelkező) festéklézerrel is tudunk kompresszibilitást mérni. A fluoreszcencia vonalkeskenyedés (FLN) (Personov, 1983) technikáját kombináltuk a nagy nyomással, és kidolgoztuk a módszerrel való kompresszibilitás-mérés elméleti hátterét.

2.5.5. A hideg-, nyomás- és hődenaturált fázisok szerkezeti összehasonlítása (T5)

A hideg-denaturáció felfedezése után merült fel a kérdés, hogy a fehérje hő- és hidegdenaturált állapotai ugyanolyan szerkezetet mutatnak-e? Természetesen számunkra, mint a nagy nyomás hatásaival foglalkozók számára a kérdés kiegészült a nyomásdenaturált szerkezetnek az előbbiekhöz való viszonyával. A fehérjék elliptikus fázisdiagramjának (Hawley, 1971) fényében a hideg- és a hődenaturáció úgy tekinthető, mint az elliptikus fázishatárt elvileg végtelen sok lehetséges irányban átlépő denaturációk két lehetséges megvalósítása. Az elliptikus fázisdiagram elmélete eleve csak egyféle denaturált állapottal számolt, az elméletbe nem is illeszkedett a denaturált állapotok különbözősége. A hő- és hideg-denaturáció összehasonlítását több szerző is megpróbálta, de a kísérletekből kibontakozó kép ellentmondásos volt. Privalov (1990) a hideg- és hődenaturált állapotokat azonos konformációs állapotoknak tekintette, mivel termodinamikai paramétereik hasonlóak voltak. Ugyanilyen eredményre jutottak Huang és Oas (1996) a lambda-represszor

fehérjén végzett cirkuláris dikroizmus és 1D NMR méréseikkel. Mások viszont (Griko és Kutysenko, 1994, Richardson és mtsai, 2000) úgy találták, hogy a béta-laktoglobulin különböző strukturális átrendeződéseken megy át hideg- ill. hődenaturáció során. A nyomás-denaturáció utáni fehérjeszerkezetek detektálását technikai problémák nehezítették.

Annak eldöntésére, hogy a fehérje szerkezete a különböző típusú denaturációk után ugyanazt a denaturált állapotot veszi-e fel, vagy több denaturált fázis létezik, az általunk használt nagy nyomású FTIR spektroszkópiai módszer ideálisnak tűnt. A gyémánt cellában elő lehetett állítani a denaturációhoz szükséges nyomást, és az infravörös spektrum alapján széles hőmérséklet- és nyomás-tartományban a fehérjeszerkezetre vonatkozóan is becslést lehetett adni. A fő kérdés az volt, hogy a hideg- hő- és nyomásdenaturált szerkezetek összehasonlításával a további fázishatárok létezésének lehetőségét valószínűsítsük, vagy cáfoljuk.

2.5.6. A tormaperoxidáz enzim extrém stabilitásának strukturális alapjai (T6)

A tormaperoxidáz (horseradish peroxidase, HRP) egy hem-fehérje, amely aromás szubsztrát molekulák H_2O_2 -től függő oxidációját katalizálja. A polipeptidlánc 306 aminosavból épül fel, a fehérje molekulatömege a hozzá kovalensen kapcsolódó 8 cukor oldallánccal együtt 44 kDa. A fehérjét csak mikrogravitációs körülmények között sikerült kristályosítani (Gajhede és mtsai, 1997). A kristályszerkezetben a helikális szerkezet dominál (51%). A fehérje szerkezetét két kalcium-ion is stabilizálja (Morishima és mtsai, 1986). Megmutatták, hogy legalább egy Ca^{2+} szükséges az enzimaktivitáshoz (Ogawa és mtsai, 1979). A fehérje hő- és nyomásstabilitása átlagon felüli (Hozbaur és mtsai, 1996, Chattopadhyay és Mazumdar, 2000), bár ez utóbbiról méréseink előtt csak az volt ismert, hogy legalább 800 MPa-ig nem történik denaturáció, ugyanis ennél nagyobb nyomást Ogunmola és mtsai (1977) technikailag nem tudtak elérni.

A fehérje kiemelkedő stabilitását több tényezővel is próbálták magyarázni. A már említett kalcium ionok mellett négy diszulfid híd (Cys^{11} - Cys^{91} , Cys^{44} - Cys^{49} , Cys^{97} - Cys^{301} , Cys^{177} - Cys^{209}) is stabilizálja a szerkezetet.

Felmerül a hem csoport stabilizáló szerepe is, mivel a mioglobinnal szemben a hem csoport eltávolítása jelentős stabilitásváltozást okoz. Az apomioglobinnal nyomás- és hőstabilitása is lényegesen kisebb, mint a holofehérjéé (Smeller és mtsai, 1996).

A torma-peroxidáz többféle módon destabilizált változatát állítottuk elő, és vizsgáltuk a nyomásstabilitásukat. A molekula hem-zsebének a stabilitáshoz való hozzájárulását a hem csoport eltávolításával (apo-torma-peroxidáz), ill. fémmentes mezoporfirinrel való helyettesítésével teszteltük. Megvizsgáltuk, hogy miként hat egy szubsztrát bekötése a stabilitásra, ill. miként változik a fehérje stabilitása, ha a diszulfid hidakat redukáljuk. Ezen kívül vizsgáltuk a kalciumszegény fehérjét is.

Kísérleteinkkel arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a felsorolt tényezők közül melyik milyen mértékben járul hozzá a fehérje térszerkezetének stabilizálásához. A másik, a fluoreszcencia mérések relevanciája szempontjából fontos kérdés az, hogy megváltoztatja-e a porfirinnal való helyettesítés a fehérje szerkezetét ill. stabilitását.

2.5.7. Kis hő-sokk fehérjék: az oligomeren belüli intermolekuláris kölcsönhatások és a chaperon aktivitás kapcsolata. (T8)

A kis hő-sokk fehérjék családjába tartozó fehérjék általában 10-40 kDa molekulatömegű polipeptidláncokból épülnek fel (Naberhaus, 2002). Ezek az alegységek oligomerekké állnak össze, amelynek teljes molekulatömege akár 1 MDa is lehet. A családba tartozó fehérjék elsődleges szerkezete hasonlóságot mutat, a térszerkezet megismerését azonban gátolja, hogy kristályosítani nem nagyon sikerült őket. Így a másodlagos és magasabb rendű szerkezetek jelenleg csak három ilyen hő-sokk fehérje esetén ismertek.

A hő-sokk fehérjék funkciója a szervezetben általánosan a széttékeredő fehérjék aggregációjának megakadályozása. A kis hő-sokk fehérjék maguk nem segítik elő ugyan a fehérje helyes felgombolyodását, egyes dajkafehérjékkel ill. fehérjerendszerekkel ellentétben, de egyrészt esélyt adnak a destabilizálódott fehérjének az újratekeredésre, másrészt bizonyos esetekben az aggregáció gátlása is elégséges. Például a szemlencsében az aggregáció elkerülése a legfontosabb a szemlencse átlátszóságának a megtartása szempontjából.

Két fehérjét vizsgáltunk, az alfa krisztallint és az MjHSP16,5-öt. Ez utóbbi a *Methanococcus jannaschii* archeobaktériumból izolált hő-sokk fehérje. Az alfa

krisztallin a szemlencse fő fehérjekomponense. Jelentős szerepe van a szemlencse átlátszóságának és a megfelelő törésmutatójának biztosításában (Delaye és Tardieu, 1983, Xia és mtsai, 1996). Az alfa krisztallin aggregációja lencsehomályhoz, kataraktához vezet (Takemoto és Boyle, 1998, Derham és Harding, 1997). Másrészt az alfa krisztallin védő funkciójának kiesése is szerepet játszhat a katarakta kialakulásában (Derham és Harding 2002).

Az alfa krisztallin oligomerek egymástól kismértékben különböző A és B alegységekből épülnek fel. A heterooligomerek átlagos mérete kb. 800 kDa, szerkezetükre többféle modell született (Farnsworth és mtsai, 1998, Smulders és mtsai, 1998), amelyek közül röntgenkrisztallográfiai vizsgálatok hiányában nehéz választani. Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal gömb alakú, közepén lyukas oligomereket mutattak ki (Horwitz, 2003).

Az alfa krisztallin működésének szerkezeti alapjai nem teljesen tisztázottak. A hőmérséklet emelésével 35°C környékén a chaperon aktivitás növekszik (Raman és Rao, 1997), ami korrelál a fehérje kollektív mozgásainak megindulásával (Tölgyesi és mtsai, 1999). A chaperon aktivitás viszont gyakorlatilag teljesen eltűnik pH 6 alatt. Nem volt világos az oligomerek méretének és a chaperon aktivitásnak az összefüggése, erre vonatkozóan az irodalomban eltérő adatok láttak napvilágot (Burgio és mtsai, 2000, van Montfort és mtsai, 2001).

Az MjHSP oligomer 16,5 kDa-os alegységekből épül fel. Az oligomereket 24 monomer alkotja, amelyek oktahedrális szimmetriájú oligomert alkotnak (Kim és mtsai, 1998). A szerkezet egy üreges gömbre hasonlít, amelynek külső mérete 12 nm, belső átmérője 6,5 nm és a felületén 14 kis nyílás található. A monomerben tíz béta szerkezetű fehérjeszakasz van, amelyek közül az egyik a szomszédos monomerrel hat kölcsön, ezért tulajdonképpen azt mondhatjuk, hogy az oligomer dimerekből épül fel.

A *Methanococcus jannaschii* termofil baktérium, ennek megfelelően az MjHSP16,5 nem mutat chaperon aktivitást szobahőmérsékleten, viszont 60 °C felett élesen növekszik az aktivitása. Bár egyes szerzők szerint bizonyos fokú disszociáció szükséges a chaperon aktivitás növekedéséhez (Gu és mtsai, 2002), mások a chaperon funkció és az asszociáció foka, tehát az oligomerméret között mutattak ki pozitív korrelációt (Burgio és mtsai, 2000, Kim és mtsai 2003).

Munkánk célja mindkét fehérje esetén az volt, hogy a nyomás disszociáló hatásának felhasználásával, FTIR- és fluoreszcencia-spektroszkópia valamint fényszórásmérés segítségével megpróbáljuk az oligomerméret, a fehérjeszerkezet és a chaperon aktivitás közti összefüggést felfedni. Fő kérdésünk az volt, hogy az oligomerméret növelése valóban szükséges-e a chaperon aktivitás növekedéséhez.

2.5.8. A NADPH protoklorofillid oxidoreduktáz enzim kinetikájának vizsgálata, a protoklorofillid fototranszformációjának és az azt követő strukturális átalakulások aktivációs paramétereinek meghatározása (T9)

A fotoszintézis kétségtelenül az egyik legalapvetőbb folyamat a növények anyagcseréjében. A fotoszintézis fenntartásához állandó klorofill-szintézisre van szükség. A klorofill-bioszintézis egyik lépése a porfiringyűrű 17. és 18. szénatomja közti kettős kötés telítése, mely a zárwatermőkben csak fény hatására megy végbe. Az átalakítást végző NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz (POR) enzim működéséhez ugyanis fény szükséges (Porra, 1997, Masuda és Takamiya, 2004).

Sötétben nevelt növények esetén ez a lépés nem következik be, így a szintézis megreked a protoklorofillidnél (Sundqvist és Dahlin, 1997). Ezekben a növényekben kloroplasztiszok helyett ún. etioplasztiszok alakulnak ki, melyekben speciális membránstruktúrához kötöten (főként az ún. prolamelláris testekben) van jelen a protoklorofillid és a POR enzim is (Böddi és mtsai, 1989). Fény hatására megtörténik az enzimreakció, ami a porfirin π -elektron rendszerének átrendeződése miatt a fluoreszcencia emisszió jelentős spektrális eltolódását eredményezi. (Az enzimhez kötött, ún. fotoaktív protoklorofillid emissziós maximuma 655 nm, a belőle képződő, enzimhez kötött klorofillidé pedig 690 nm.) A fototranszformáció után a prolamelláris testekről vezikulák válnak le (Ryberg és Sundqvist 1988). A korábban köbös fázisú, kristályrácsszerű membránszerkezet szétesik apró membránlamellákra, egyes komponensei (lipidek, fehérjék) beépülnek a néhány nap alatt kialakuló, kloroplasztiszokra jellemző tilakoid-membránokba (Ryberg és Dehesh 1986). A folyamat kezdeti lépésének spektrális jele az ún. Shibata eltolódás[‡] (Shibata, 1957), a

[‡] Szigorúan véve a Shibata eltolódás elnevezés az intakt levelekben végbemenő folyamatra vonatkozik. Egyes kutatók ezért a homogenátumon mért hasonló spektrális eltolódást ezért Shibata-szerű eltolódásnak hívják.

fototranszformáció során képződött klorofillid pigment spektrumának kék-eltolódása, melynek karakterisztikus ideje 20-60 perc. Nem teljesen eldöntött tény, hogy a membránstruktúra átrendeződése (Atrus és mtsai, 1992), vagy a fehérje-pigment komplexek dezaggregációja (Wiktorsson és mtsai, 1993), esetleg a POR enzim konformáció-változása (Oliver és Griffiths, 1982, Zhong és mtsai, 1996) a meghatározó lépés a Shibata-eltolódás mögött álló strukturális folyamatok közül.

A kémiai folyamatok nyomással kétfajta módon befolyásolhatók. A nyomás hatására egyrészt eltolódhat az egyensúly, ami a hétköznapi életben előforduló nyomások esetén leginkább csak a gázfejlődéssel járó folyamatokat befolyásolja ($\Delta V \sim 10^4 \text{ cm}^3/\text{mol}$). Nagy nyomás esetén azonban már akkor is kapunk mérhető hatást, ha a kiindulási és a végállapot közti térfogatkülönbség a hidrogénatom térfogatának nagyságrendjébe esik ($\Delta V \sim \text{cm}^3/\text{mol}$) (van Eldik és mtsai 1989). A másik jelentős hatás a folyamat kinetikájának megváltozása, az aktivált állapot térfogatának függvényében (Balny és mtsai, 1997). Ez utóbbi jelenséget használtuk ki a porfirinszintézis fénytől függő lépésének tanulmányozására.

A sötétben csíráztatott, 14 napos búzanövények leveleiből homogenátumot készítettünk. A POR enzimet és protoklorofillidet tartalmazó membránfragmentumokból álló homogenátum különösen alkalmasnak tűnt a vizsgálatok elvégzésére, mivel a megvilágító fény egyszerre indította el a vizsgálni kívánt reakciót, és egyidejűleg szolgált a méréshez használt fluoreszcencia gerjesztésre is.

Az aktivációs paraméterek meghatározásával a fototranszformáció mechanizmusának mélyebb megértéséhez kívántunk adalékot adni, valamint a Shibata-szerű eltolódás aktivációs paramétereinek, és nyomástól való függésének tanulmányozásával a lipidek szerepét kívántuk felderíteni a folyamatban.

2.5.9. A metodikai fejlesztések háttere és motivációi (T10, T11)

A Kauppinen és mtsai által kifejlesztett, a spektrális felbontást növelő módszer, a Fourier öndeconvolúció (Kauppinen és mtsai, 1981a, Kauppinen és mtsai 1981b) munkánk kezdetén már bekerült a spektrométerekkel szállított kereskedelmi szoftverekbe. Ez ugyan nagyban elősegítette a módszer elterjedését, viszont sok új, felkészületlen felhasználót eredményezett, akik nem látták át a módszer matematikai alapjait. Ennek köszönhetően az irodalomban durván „túldeconvolvált”,

műtermékekkel megtűzdelt spektrumok jelentek meg, amelyek analízise természetesen nem vezetett tudományos tényekhez. Ez indított arra, hogy olyan módszert fejlesszek ki, ahol a dekonvolúció paraméterei objektív szempontok alapján optimalizálhatók.

A másik metodikai fejlesztés a spektrumvonalak pozíciójának pontosságára vonatkozik. A spektroszkópiában a mért spektrumvonalak helyzetének megállapítása alapvető fontosságú feladat. A spektrális csúcsok eltolódása fontos információt közvetíthet arról a molekuláris szerkezetről, amelyhez a spektrumvonal rendelhető. A csúcspozíció meghatározására leggyakrabban használt algoritmust Savitzky és Golay (1964) fejlesztették ki. A módszer azon az ötleten alapul, hogy ha a diszkrét x_i pontokban megmért spektrum x tengelye (x lehet hullámhossz, hullámszám, stb.) egyenletes beosztású, akkor a spektrumra illesztett polinom paraméterei megkaphatók a spektrum $y(x_i)$ értékeinek lineárkombinációjaként. A lineárkombinációhoz szükséges együtthatókat kiszámolták, amelyet később Steiner és mtsai (1972) helyesbítettek. A módszer azonban nem adott becslést a meghatározott pozíciók megbízhatóságára.

Egyes spektrális vonalak eltolódását fizikai paraméterek, pl. nyomás, hőmérséklet, pH, stb. mérésére használják (Forman és mtsai, 1972). Ilyenkor különösen fontos, hogy a csúcspozíciónak ne csak az értékét ismerjük, hanem a pozíció hibájára is becslést tudjunk adni. A nyomásmérésekben használt kalibránsok spektrumvonalának eltolódása különösen kicsi, ami a csúcspozíció pontos meghatározását igényli, és ilyenkor elengedhetetlen a pozíció pontosságának megadása is. Ez indított arra, hogy megvizsgáljam a csúcspozíció-meghatározás algoritmusát és eljárást adjak a spektrális csúcsok pozícióhibájának kiszámolására.

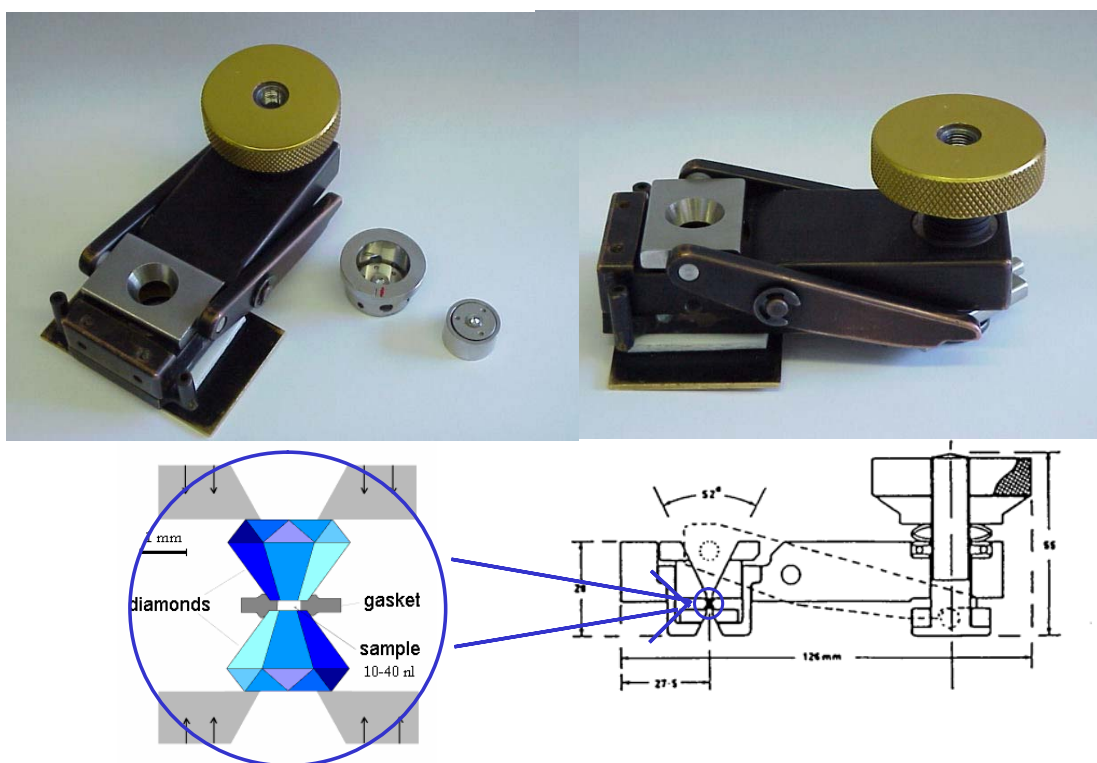
3. A legfontosabb módszerek

A tézisekben bemutatott munka főként nagy nyomású infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai méréseken alapul, ezért először részletesen a nagy nyomású mérések technikai hátterét mutatom be.

3.1. A nagy nyomás előállítása és mérése

A nagy nyomás előállításának két elterjedt technikája van. Az egyik az ún. nagy nyomású bomba, amely egy vastag falú mérőcella, tipikusan néhány ml térfogattal. Az optikai méréseket általában zafir ablak segítségével valósítják meg. Ilyen cellával készültek a 8. és 9. tézispontokban felsorolt munkák. A cellához egy nyomásfokozó, valamint egy nyomásmérő (Bourdon mérő, ill. Nova Swiss gyártmányú deformációs nyomás távadó) tartozik (Sherman és Stadtmüller, 1987). A nyomás-átvivő anyag folyadék, esetünkben desztillált víz volt, hogy a szerves olajokban előforduló fluoreszkáló szennyeződések kiküszöböljünk. Az általunk használt (Unipress gyártmányú, U103 típusú) cellában a hozzá használt Nova Swiss gyártmányú pumpával és mérőrendszerrel maximum 600 MPa nyomást tudtunk előállítani.

A másik módszer, amellyel az előzőnél lényegesen nagyobb nyomást is el lehet érni, az ún. gyémánt cella (Diamond Anvil Cell = DAC) (Jayaraman, 1986). Ennek lényege, hogy a nyomást nagyon kis térfogatban (~50 nl) állítja elő. A mintát két oldalról a legkeményebb anyag, azaz gyémánt veszi körül, amely átlátszósa miatt optikai méréseket is lehetővé tesz. A gyémántok között található egy rozsdamentes acéllemez, amelynek közepébe fúrt 0,5 mm átmérőjű lyukban helyezkedik el a minta (8. ábra). A nyomás a két gyémántra kifejtett nyomóerővel növelhető. Ilyen típusú, Diacell gyártmányú cellát használtam az infravörös és a nagyfelbontású fluoreszcens méréseknél. A nyomás mérésére spektroszkópiai eszközöket kell használni, azaz a mintatérbe egy nyomásérzékeny ún. belső kalibránst kell elhelyezni. A leggyakrabban a rubin 694,3 nm-es fluoreszcencia emissziós vonalát használják (Forman és mtsai, 1972), amelynek segítségével a nyomás egészen a 100 GPa nyomásig mérhető (Bartnett és mtsai, 1973, Mao és mtsai, 1978). Ezt használtam az 5. tézispontban leírt mérésekben. A fluoreszcens csúcs nyomástól való függése 30 GPa alatt lineáris, az eltolódás 0,365 nm/GPa meredeksége kriogenikus



8. ábra. A Diacell gyártmányú, nagy nyomást előállító ún. gyémánt cella felépítése. Ilyen cellát használtam az infravörös mérésekhez. Az alacsony hőmérsékletű fluoreszcens mérésekben használt cella elve ugyanez volt, csak a gyémántok összenyomását egy héliumgázzal működtetett pneumatikus membrán biztosította.

hőmérsékleteken sem változik (Noack és Holzapfel 1979). A csúcspozíció a hőmérséklet függvényében is eltolódik, (Silvera és Wijngaarden, 1985) ezért a hőmérsékletet mindig mértem és figyelembe vettem. A két egymás melletti (692,7 és 694,3 nm-es) spektrumvonal intenzitás-arányával a minta hőmérséklete 100 K alatt közvetlenül is ellenőrizhető (Weinstein, 1986). A nagyon kis eltolódás miatt a rubin spektrumával együtt mindig felvettük egy neonlámpa vonalait is, és az eltolódást ezekhez a vonalakhoz viszonyítottuk. A nyomásmérés pontosságát a 11 sz. metodikai tézispontban tárgyalom.

Az infravörös mérésekhez praktikusabb egy olyan anyag használata, amelynek infravörös vonala ismert módon tolódik a nyomás függvényében. Az alfa kvarc 801 cm^{-1} -es (Wong és mtsai, 1985) vagy a bárium-szulfát (BaSO_4) 983 cm^{-1} -es vonala (Wong és Moffat, 1989) használatos erre a célra. A dolgozatban szereplő infravörös munkákban a BaSO_4 vonalának eltolódását használtam a nyomás meghatározására (1-3,5-8 tézispontok).

3. 2. Az infravörös mérések

Az infravörös méréseket Bruker IFS66 spektrométerrel mértem, amely 0,25x0,25 mm-es MCT detektorral rendelkezett (1-3, 5-8 tézispontok). Az MCT detektor nemlinearitását szerencsésen ellensúlyozta az a tény, hogy a gyémánt cella (Diacell Products) kis mérete miatt még fókuszáló NaCl lencsével is csak nagyon kis jelet kaptunk (a telítési intenzitás $\leq 10\%$ -át), így a kezdeti lineáris tartományban maradtunk. A spektrumok felbontása 2 cm^{-1} volt. A jel/zaj viszonyt 256 spektrum átlagolásával javítottuk. A spektrumok analíziséről részletesen a 10. és 11. metodikai tézispontokban szólok.

Az infravörös mérésekben a fehérje-konformációra jellemző amid I sávval teljesen egybeesik a víz deformációs rezgése. Ennek a zavaró hatásnak a kiküszöbölésére az infravörös mérésekben víz helyett nehézvizet (D_2O) alkalmaznak. Puffer oldatainkat mi is minden esetben nehézvízben készítettük el, és pH helyett pD értéket adtunk meg. A pD-t úgy határoztuk meg, hogy a pH mérőről leolvasott értékhez 0,4-et adtunk (Glascol és Long, 1960).

3. 3. A 2D korrelációs FTIR spektroszkópia

Ezt a módszert Noda (1990, 1993) fejlesztette ki, eredetileg polimerek periodikus mechanikai igénybevételének vizsgálatára. Lényege az, hogy a spektrális változásokat külső perturbáció (p) függvényében követjük. Praktikus okokból általában 2^n darab spektrumot mérünk a perturbáció függvényében: $y(\nu, p)$. Ezekből az átlag spektrum levonása után kapjuk az ún. dinamikus spektrumokat: $\tilde{y}(\nu, p) = y(\nu, p) - \bar{y}(\nu)$. A komplex korrelációs intenzitásokat a spektrumoknak a perturbáció szerinti Fourier transzformációjával definiáljuk:

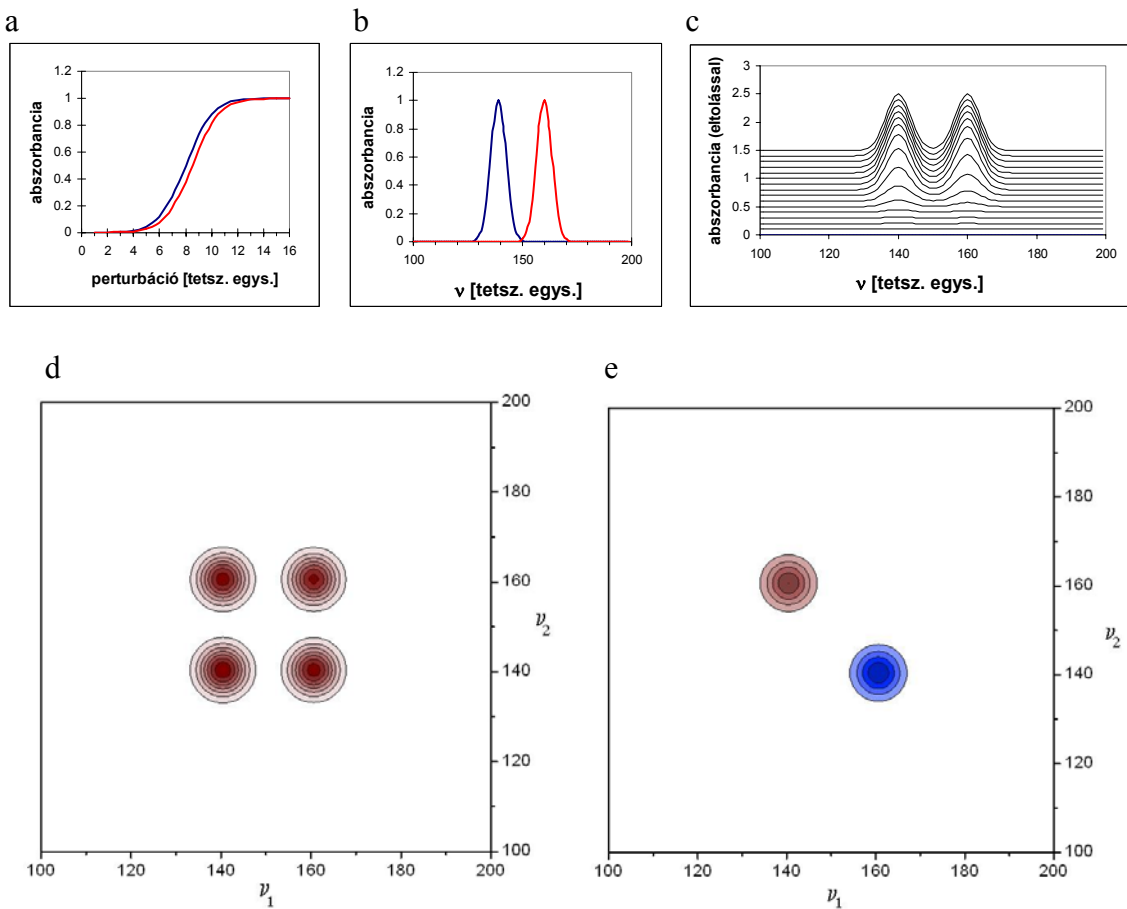
$$\tilde{Y}_\nu(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{y}(\nu, p) e^{-i\omega p} dp$$
. Végül a komplex kétdimenziós korrelációs intenzitást a

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} \tilde{Y}_{\nu_1}(\omega) \tilde{Y}_{\nu_2}^*(\omega) d\omega$$
 integrál adja. Grafikusan ezt két ábrán

jelenítik meg, úgy, hogy a $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ -t és a $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ -t szintvonalakkal ábrázolják a ν_1, ν_2 síkon. A módszer eredményeként a szerzők szerint az átlapoló spektrális komponensek szétválaszthatók, ill. a spektrális változások egymásutánisága a

kétdimenziós spektrumokról meghatározható a szinkron ($\Phi(v_1, v_2)$) és aszinkron ($\Psi(v_1, v_2)$) 2D spektrumok adott v_1, v_2 párhoz tartozó előjeleiből. A definícióból következően a szinkron 2D spektrum szimmetrikus, az aszinkron pedig antiszimmetrikus (azaz előjelet vált) az átlóra való tükrözést illetően.

Noda szabályokat állított fel annak eldöntésére, a különböző hullámszámmal található spektrumvonalak egymással korreláltak, vagy antikorreláltak változnak-e, ill., hogy melyik spektrális vonal változása előzi meg a másikat. Ezek a szabályok kissé rövidítve, ill. összevonva a következők:



9. ábra. Két egymást követő spektrális változás 2D korrelációs spektroszkópiai analízise (szimulált spektrumokon). a) A spektrumvonalak amplitúdóinak függése a perturbációtól. b) A két spektrumvonal pozíciója. c) A szimulált spektrumok (egymáshoz képest a jobb ábrázolhatóság érdekében eltolva). d) Szimmetrikus e) aszimmetrikus 2D spektrumok. (A barna szín a pozitív, a kék a negatív értékeket mutatja. Mindkét ábra 1-re normált, és a 0 körüli $\pm 0,2$ tartomány fehér.)

- A szinkron spektrum pozitív csúcsa a ν_1, ν_2 hullámszámpárnál ($\Phi(\nu_1, \nu_2) > 0$) azt jelzi, hogy a két spektrumvonal amplitúdója egyirányba változik, azaz mindkettő növekszik vagy mindkettő csökken. Negatív csúcs esetén természetesen az amplitúdók ellentétesen változnak.
- Az aszinkron 2D spektrumon a pozitív keresztcsúcs a ν_1, ν_2 hullámszámpárnál ($\Psi(\nu_1, \nu_2) > 0$) azt jelenti, hogy ν_1 változik előbb mint ν_2 . Természetesen negatív $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ esetén a sorrend megfordul. Ugyanígy megfordul akkor is, ha a szinkron 2D spektrum ν_1, ν_2 -nél negatív.

Szigorúan véve ezek a relációk szinuszos perturbáció esetére lettek megfogalmazva (Noda, 1990), de a szerző később kiterjesztette a módszert azokra az esetekre is, ahol a $\mathcal{Y}(\nu, p)$ függvény a p -től exponenciálisan függ, valamint Lorentz-görbét követő függvényekre is (Noda, 1993). Saját szimulációs számolásainkkal bebizonyítottuk, hogy a fehérjéknél várható szigmoid típusú függvények (pl.: $\frac{1}{1 + e^{-a(p-p_0)}}$, ahol a és p_0 paraméter) esetén is igazak a fenti szabályok. Ilyen, szigmoid alakban változó szimulált spektrumvonalakkal szemlélteti a fenti szabályokat a 9. ábra.

3. 4. A nagyfelbontású fluoreszcencia mérések

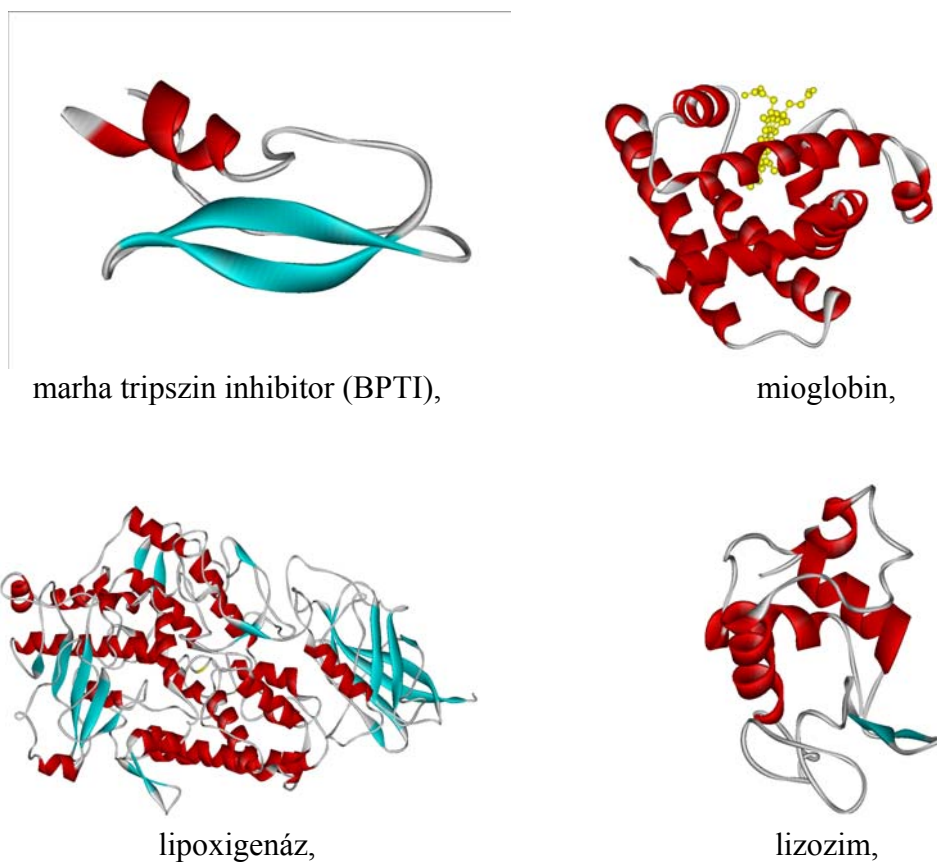
A nagyfelbontású fluoreszcencia méréseket (fluorescence line narrowing, FLN) (5. tézispont) egy erre a célra laboratóriumunkban felépített összeállítással mértem, ami egy argon lézerrel gerjesztett hangolható festéklézerből (Coherent Innova 307 és 899 ring laser), egy zárt ciklusú hélium kriosztátból (Cryophysics) és egy nagyfelbontású monokromátorból (Jobin Yvon THR1000), valamint fotoelektron-sokszorozóból (Hamamatsu) állt. A kriosztát ún. hideg fejére volt rögzítve a gyémánt cella, amelyben a nyomást egy pneumatikus rendszeren keresztül a bevezetett 1-10 MPa nyomású héliumgázzal a 0-2 GPa tartományban változtattuk. A nyomást a rubin fluoreszcenciájának felhasználásával mértük (Jayaraman, 1986, Forman és mtsai 1972).

A konvencionális fluoreszcencia mérésekhez a fentebb leírt „bomba” típusú cellát használtuk, amelyet a spektrofluoriméter (Edinburgh Instruments CD9000 ill. Jobin Yvon Fluorolog3) mintaterébe szereltünk (7. és 8. tézispontok).

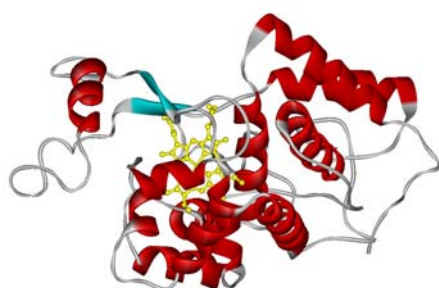
3. 5. A vizsgált fehérjék

A fehérjéket a Sigma cégtől vásároltuk, ha ez másképp nincs jelezve. Kivétel az MjHSP16.5 , amit az együttműködő partnerektől kaptunk (Kim és mtsai 1998). A tormaperoxidáz hem csoportjának helyettesítését Teale (1959) módszerével végeztük.

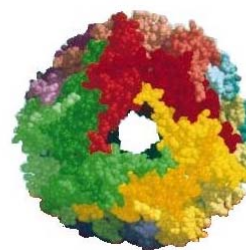
A legtöbbet használt fehérjék röntgenkristallográfiás szerkezete a PDB adatbázis (Protein Data Bank: www.rcsb.org/pdb/) alapján a 10. ábrán látható.



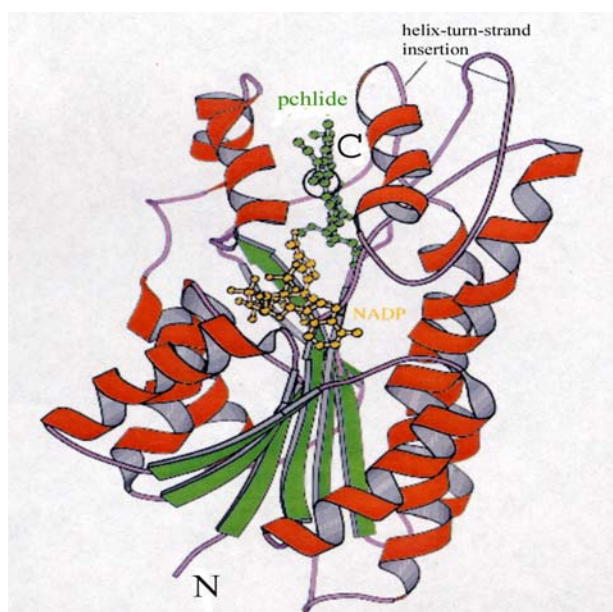
10. ábra. A méréseinkben leggyakrabban használt fehérjék röntgenkristallográfiával meghatározott térszerkezete a PDB adatbázis alapján (kivéve a POR enzimet és a klorofillt). Az ábrák különböző méretarányúak. (Az ábra folytatódik a köv. oldalon)



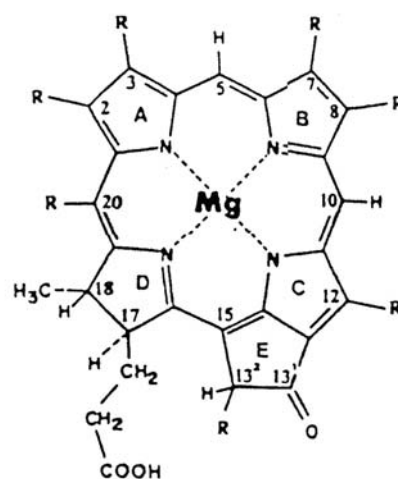
tormaperoxidáz,



MjHSP oligomer



NADPH-protoklorofillid-oxidoreduktáz (POR).
(Townley és mtsai, 2001)



klorofillid

10. ábra (folytatás).

4. Új tudományos eredmények

4.1 A fehérjék másodlagos szerkezetének nagy nyomás hatására történő elasztikus változásának kvantitatív jellemzése *in situ* nyomáskísérletekben FTIR spektroszkópia segítségével. (T1, P1, P3^{*})

Amint azt a bevezetőben már említettem, a nyomás egyrészt elasztikus deformációkat képes létrehozni a fehérjén, másrészt elegendően nagy nyomás konformációs változást is okozhat (Frauenfelder és mtsai, 1990). Előttünk még nem végeztek olyan infravörös spektroszkópiára alapuló fehérjeszerkezet-vizsgálatokat, ahol a szerkezetet „*in-situ*” nagy nyomáson határozták meg. Mi olyan módszert kerestünk, amelynek segítségével mind az elasztikus, mind pedig a konformációs szerkezetváltozásokat kvantitatívan követni tudjuk. Az elasztikus és konformációs szerkezeti változások az infravörös amid I sáv komponenseinek eltolódásában, amplitúdó-változásában ill. konformáció-változás esetén új sávok megjelenésében nyilvánulnak meg.

A Byler és Susi (1986, 1995) által (a normál körülmények közti fehérje konformáció-analízis céljára) kidolgozott, dekonvolúción és azt követő görbeillesztésen alapuló technikát alkalmaztuk és fejlesztettük tovább.

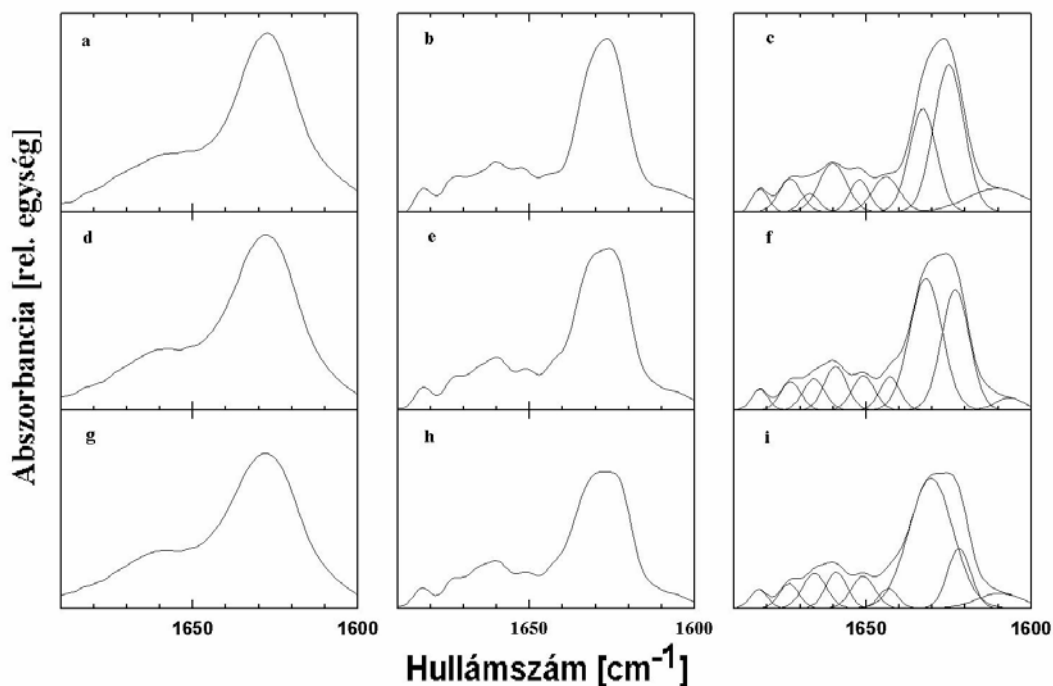
A továbbfejlesztés egyrészt az illesztésre irányult, mi ugyanis egyszerre illesztettük az összes paramétert, és nem rögzítettük egyiket sem, hiszen a nyomás hatására történő spektrális eltolódásokat meg kellett engednünk. A másik fejlesztés a dekonvolúció paramétereinek optimalizálását célozta, ezt a 10 sz. metodikai tézispontban részletezem.

Az általunk alkalmazott illesztéses technikával nemcsak az egyes spektrum-komponensek mennyiségi arányát sikerült meghatározni, hanem a komponensek nyomástól függő elcsúszása is értelmet nyert, mint a hidrosztatikai nyomás elasztikus deformációt okozó hatásának megnyilvánulása.

^{*} (T_n, P_m) azt jelenti, hogy a fejezet az n.-ik tézispont eredményeit részletezi és a P_m jelű saját publikáción alapul.

4.1.1. A gramicidin A nagy nyomás által indukált strukturális átalakulása

A módszert egy kis polipeptid, a gramicidin A esetén alkalmaztuk először. Ez ugyan nem igazi fehérje, hiszen csak 15 aminosavból álló polipeptid, és a szerkezetei sem a szokásos másodlagos szerkezeti elemekből (α -hélix, β -lemez...) épülnek fel, azonban



11. ábra. A gramicidin A infravörös spektruma az amid I tartományban néhány kiválasztott nyomás esetén. Az a), d), g) ábrákon az eredeti mért spektrumok, a b), e), h) ábrákon a dekonvolált spektrumok, a c), f), i) ábrákon pedig a Gauss komponensekkel megillesztett dekonvolált görbék láthatók. A nyomásértékek: a), b), c): 44 MPa.; d), e), f): 0,91 GPa; g), h), i): 1,35 GPa.

egyszerű felépítése – azaz, hogy egy molekulán belül nem keveredik több másodlagos szerkezeti elem – lehetőséget teremtett a módszer kipróbálására.

A gramicidin A-t a DOPC (dioleoil-foszfátidilkolin) membránba úgy inkorporáltuk, hogy a gramicidint DOPC-vel együtt 1:10 molarányban kloroformban oldottuk fel, majd a kémcső falára szárítottuk, és utána nehézvizet adtunk hozzá. 4 óra hosszan 45°C-on inkubáltuk, közben erősen kevertük (P1).

A mintát ezután a 3.2 pontban leírt gyémánt nyomáscellába töltöttük és a 3.3 pontban leírtak szerint (0-1,35 GPa-ig) mértük az infravörös spektrumokat.

A 11. ábra mutatja három nyomáson (44 MPa, 0,91 GPa, 1,35 GPa) a mért spektrumokat, a spektrális feloldóképesség-növelő módszerrel, a Fourier öndekonvolúcióval felbontott spektrumokat, valamint a Gauss-komponensekkel megillesztett dekonvolvált görbéket.

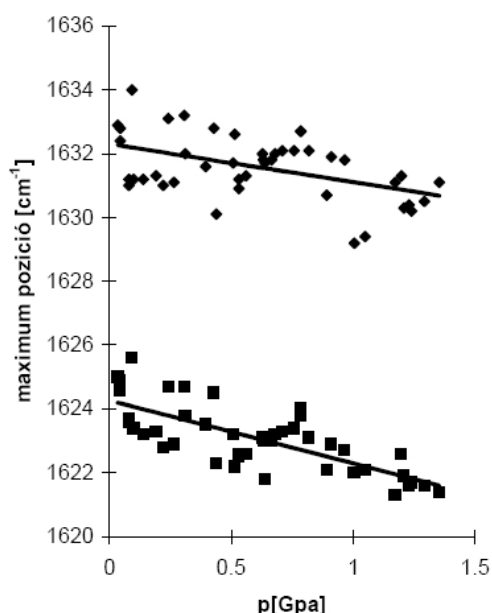
A dekonvolúciónál Lorentz alakú vonalalak-függvényt (2.2.4. fejezet $L(\nu)$ függvény) feltételeztünk 15 cm^{-1} -es félértékszélességgel (teljes szélesség a magasság felénél).

Teljesen homogén mintánál az elméleti vonalalak egyetlen Lorentz-görbe. A minta inhomogenitása miatt az elméleti Lorentz-görbék olyan sokaságát kapjuk, amelyben a rezgő rendszer környezetének inhomogenitása miatt a maximum hely eloszlása (általában jó közelítéssel) Gauss-függvénnyel írható le. A Lorentz-függvény tehát még egy Gauss-görbével konvolválódik, így adva a Voigt-görbének nevezett alakot. Ennek az a szépséghibája, hogy nem fejezhető ki zárt alakban.

A dekonvolúció során a Voigt-görbe Lorentz-összetevőjét próbáltuk figyelembe venni, a görbeillesztésnél pedig a Gauss-t. A dekonvolúcióval a Lorentz-alakot távolítottuk el a spektrumból, és így jó közelítéssel a Gauss-komponens maradt meg, amit megillesztettünk. Mivel a konvolúció kommutatív, mindegy, hogy melyik komponenst távolítjuk el először. Ennek a választásnak technikai okai is vannak, ugyanis a Lorentz-függvény lassabban csökken mint a Gauss-függvény, Fourier transzformáltja viszont gyorsabban csökken, így a vele való dekonvolúció hatásosabb volt, mint a Gauss-függvénnyel végzett.

Az amid I sávban két fő komponenst találtunk egymáshoz közel (1624 és 1632 cm^{-1}). Ezeket a szerves oldószerekben végzett saját és irodalmi mérések alapján a kettős hélix és a dimer szerkezetekhez rendeltünk. A hozzárendelés alapja az volt, hogy Naik és Krimm normál módus számolásai azt mutatták, hogy a $\beta^{5,6}$ antiparallel dupla hélix amid I vibrációja 7 cm^{-1} -el alacsonyabb hullámszámnál van, mint a csatornát formáló $\beta^{5,6}$ dimeré. Bár a konkrét kiszámított értékek mintegy 1%-kal nagyobbak voltak az általunk kapottnál, ez az eltérés az abszolút értékekben az ilyen számolásoknál megszokott volt. Az eltérés további oka lehet a hidrogén-deutérium kicserélődés, ugyanis mi a méréseinket nehézvízben végeztük. Kísérleti munkák is azt mutatták, hogy telítetlen zsírsavláncú lipidek esetén, – mint amilyen az általunk használt DOPC is volt – a gramicidin A túlnyomórészt dupla hélix alakot vesz fel

(Sychev és mtsai 1993), ami ugyancsak alátámasztotta, hogy az atmoszferikus nyomáson domináló 1624 cm^{-1} -es Gauss-komponens a dupla hélixhez rendelhető. Urry és mtsai (1983) a lizolecitinbe ágyazott dimer (csatorna) szerkezetű gramicidint



12. ábra. A gramicidin A amid I sávjának két fő Gauss-komponensének pozíciója a nyomás függvényében.

KRS-5 ablakra[†] kiszárítva a 1633 cm^{-1} hullámszámnál találtak elnyelési maximumot. Ezek a kísérleti és elméleti eredmények alátámasztják a komponensek fenti hozzárendeléseit.

Az amid I sáv többi kis intenzitású komponensét a hélixek végén található aminosavakhoz társítottuk, ami a területarányok alapján ésszerű feltételezésnek tűnt. Ezek az aminosavak a vízzel, illetve esetlegesen a lipidekkel alkotnak hidrogénhidat, ezért az amid frekvencia ezeknél az

aminosavaknál nem jól definiált. Emiatt a kis intenzitású komponenseket nem használtuk a továbbiakban, hanem csak a két fő komponensre koncentráltunk. A nyomás hatására a konformációs egyensúly eltolódását tapasztaltuk, a kettős hélixről a dimer szerkezet felé. Ebből arra következtettünk, hogy a kettős hélix szerkezet nagyobb térfogatú. Ezt erősítették meg azok Monte Carlo számolások (Smart és mtsai, 1993), melyek szerint a kettős hélix közepén egy $5 \cdot 10^{-11}\text{ m}$ sugarú csatorna van, amelybe azonban nem fér be egy vízmolekula, tehát ez az üreg a kettős hélix saját térfogatának tekinthető. A dimer közepén ezzel szemben háromszor ilyen átmérőjű csatorna van, amibe már a vízmolekulák be tudnak hatolni, így az egész rendszert tekintve valóban a kettős hélix a nagyobb térfogatú, mint a csatorna, ahogy az a nyomáskísérleteinkből is adódott.

[†] A KRS-5 az infravörös technikában használt segédanyag. Összetétele: 42% TlBr, 58% TlJ.

III. Táblázat

A gramicidin A amid I sávjának két fő Gauss-komponensének pozíciójára illesztett egyenesek paraméterei.

komponens pozíciója	szerkezet	illesztett paraméterek		statisztika	
		tengelymetszet [cm ⁻¹]	meredekség [cm ⁻¹ /GPa]	korrelációs <i>t</i> -teszt <i>t</i>	<i>p</i>
1624	dupla hélix	1624,3±0,2	-2,0±0,3	7,51	<0,1%
1632	csatorna	1632,3±0,3	-1,2±0,3	3,55	<0,1%

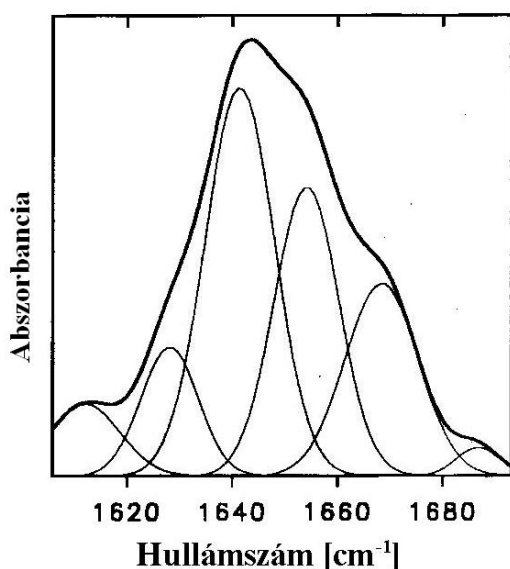
Az illesztett komponensek pozíciója a nyomás függvényében eltolódott. A 12. ábra mutatja ezt az eltolódást a két fő komponens esetén. Az illesztett egyenesek paramétereit a III. táblázat foglalja össze. A rezgési spektrum vonalainak nyomás hatására történő eltolódása jól ismert folyamat. A molekula kontrakciója következtében a rezgési frekvenciák általában növekszenek (Zakin és Herschbach 1986). Ez szemléletesen úgy látható be, hogy nyomás hatására a kötések általában megrövidülnek és ezzel együtt a rezgés elméleti leírásában szereplő potenciálvölgy is keskenyebb lesz. Így a potenciálvölgy aljának görbülete, ami a rezgési frekvenciát meghatározza, nagyobb lesz, ami frekvencianövekedéshez vezet az összenyomás során. A mi esetünkben azonban a dv/dp értékek az amid I sáv mindkét fő komponense esetén negatívak voltak. Ennek a magyarázata abban van, hogy az amid I rezgés a hidrogénhíd miatt speciálisan viselkedik. A molekula kompressziójakor a hidrogénhíd rövidülése miatt a C=O kötés körüli elektronsűrűség csökken, ami a kötés erőállandójának és végül a rezgés frekvenciájának csökkenését eredményezi. A két konformációhoz tartozó komponensek eltérő dv/dp értékéből azok eltérő kompresszibilitására következtettünk. Méréseink alapján a kettős hélix szerkezethez rendelt infravörös sáv dv/dp értéke volt a nagyobb (abszolút értékű), amiből arra következtettünk, hogy a dupla hélix szerkezet kompresszibilisebb, mint a csatorna forma. Ez a kép teljesen összecseng a fentebb említett üreges szerkezettel amely nagyobb flexibilitást enged meg.

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a gramicidin A infravörös spektrumában két komponenst azonosítottunk, amelyek nyomás hatására egymásba

alakultak. Ezeket a köztük fennálló egyensúlynak a nyomás hatására történő eltolódása alapján a csatorna és a dupla hélix szerkezetekhez rendeltük.

4.1.2. A marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (BPTI)

A nagy nyomású infravörös spektroszkópai módszert ezután a marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI) szerkezetének a nyomás függvényében történő vizsgálatára használtuk. Azt szeretnénk volna eldönteni, hogy az irodalomban akkor megjelent molekuláris dinamikai számításokban (Kitchen és mtsai, 1992, Brunne és Gunsteren 1993) talált kiemelkedően nagy nyomásstabilitás csak a túl rövid szimuláció következménye, vagy a stabilitásnak molekulászerkezeti okai vannak.



13. ábra. A BPTI atmoszferikus nyomáson mért spektrumának dekonvolválta amid I sávja az illesztett Gauss komponensekkel.

A fehérjét pD 8,6 Tris/DCl pufferben oldottuk fel 16 mM koncentrációban. Az oldatot este készítettük el, hogy éjszaka a hidrogén-deutérium kicserélődés az oldószer által elérhető fehérjesszakaszokon végbemenjen. Az oldatot a gyémánt cellába töltve infravörös méréseket végeztünk a 0-1,5 GPa nyomástartományban, a nyomást a BaSO_4 983 cm^{-1} -es vonalával mértük (ld. 3.1. fejezet).

A spektrumot a már ismertetett Fourier-öndekonvolúciós és görbe-illesztési módszerrel dolgoztuk fel.

A dekonvolúciót 19 cm^{-1} félérték-szélességű Lorentz görbével végeztük, ami az apodizációt is figyelembe véve 1,6-szoros felbontásnövelést tett lehetővé. A 13. ábra mutatja a BPTI atmoszferikus nyomáson mért amid I sávját dekonvolúció után az illesztett Gauss komponensekkel. A IV. Táblázat foglalja össze az illesztéssel meghatározott másodlagos szerkezeti elemek arányát. Eredményünket összevetettünk a különböző technikák (Raman-

szórás, röntgen-krisztallográfia, vibrációs cirkuláris dikroizmus) által szolgáltatott értékekkel.

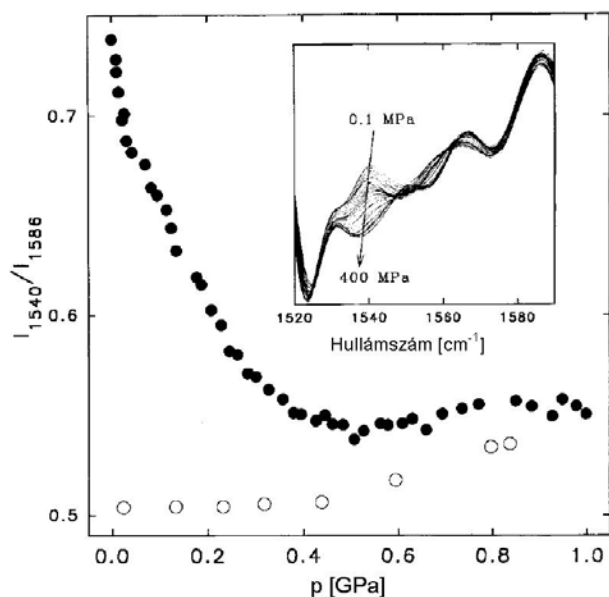
A többi módszerrel összevetve viszonylag sok rendezetlen szerkezetet kaptunk. Ennek magyarázata lehet, hogy a BPTI rövid hélicei és kisméretű (két láncból álló) béta-lemez szerkezete miatt kevés az olyan aminosav, amelyik a rendezett másodlagos szerkezet belsejében helyezkedik el. A hélix végén, ill. a lemez szélein levő aminosavak ugyanis nem csatlakoznak a polipeptid lánc másik aminosavjához hidrogén híd kötéssel, hanem ehelyett a vízzel alkotnak hidrogénhidat, ugyanúgy mint a rendezetlen szerkezetű láncok. Így csak a másodlagos szerkezet belsejében elhelyezkedő $C=O\cdots H$ hidak adnak a másodlagos szerkezetre jellemző amid I jelet. Eredményeink legjobban a Pancoska és mtsai által használt vibrációs cirkuláris dikroizmus (VCD) módszer eredményeivel egyeznek meg. Megjegyzendő, hogy a röntgen-krisztallográfiás eredmények sem voltak egyértelműek, ugyanis a táblázatban idézett két munkacsoport különböző kritériumokat használt a hélix definíciójához.

IV. Táblázat.

A BPTI másodlagos szerkezeti elemeinek különböző módszerekkel meghatározott százalékos megoszlása

Módszer	α -hélix	β -lemez	hurok	rendezetlen	hivatkozás
Raman I	23	48	20	10	Williams (1986)
Raman II	25	46	19	10	Williams (1986)
Infravörös faktor analízis	46	26	13	-	Lee és mtsai (1990)
Röntgen-krisztallográfia	26	45	16	14	Levit és Greer (1977)
VCD* I (1991)	19	26	14	37	Pancoska és mtsai
VCD II (1991)	19	27	13	37	Pancoska és mtsai
Röntgen-krisztallográfia	14	24	17	38	Kabsch és Sander (1983)
Infravörös	23	10	22	35	jelen munka

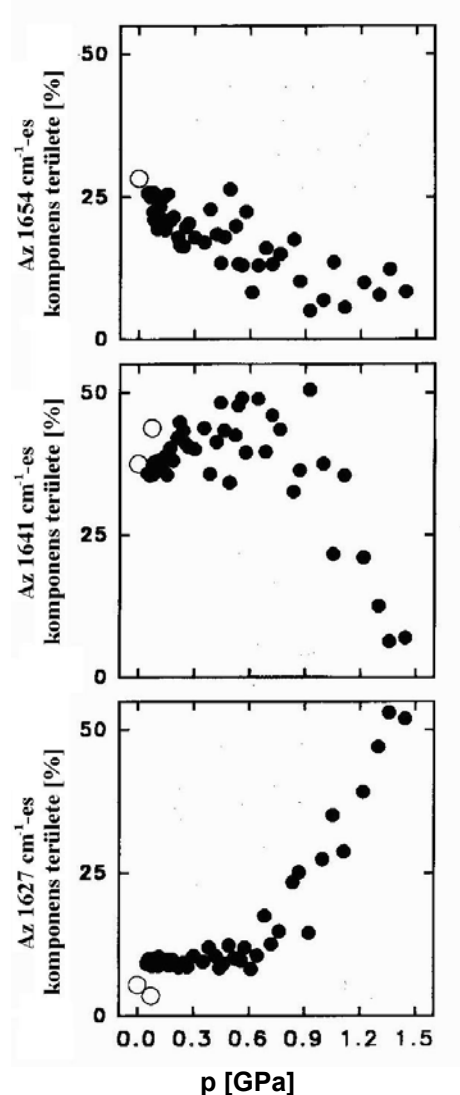
* VCD = vibrációs cirkuláris dikroizmus



14. ábra. A BPTI amid II sávjának (a 1586-os csúcshoz viszonyított) amplitúdójának változása a nyomás függvényében, az első nyomásciklus során. A betétábra a dekonvolválts spektrum amid II vonalát mutatja.

Az amid hidrogének deutériumra való kicserélődését az amid II ill. amid II' sávok segítségével detektáltuk. Az amid II rezgés normál módusában az N-H síkbeli hajlítás dominál, ezért H/D kicserélődés esetén jelentős (mintegy 100 cm^{-1} -es) izotópeltolódást mutat. A 14. ábra mutatja az amid II sáv abszorbanáciáját (a 1586 cm^{-1} -es sávra normálva) a nyomás függvényében. 400 MPa nyomásig az amid II intenzitás rohamosan csökken, tehát hidrogén-deutérium

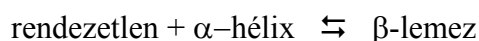
kicserélődés megy végbe. Az a tény, hogy az amid II sáv a mérés kezdetén még jelen volt, azzal magyarázható, hogy a fehérje belső magja annyira merev, hogy a (nehéz)víz számára nem elérhető, mert atmoszferikus nyomáson tíz óra alatt sem történt meg a teljes kicserélődés. Ehhez 400 MPa nyomásra volt szükség. A nyomás fellazította a harmadlagos szerkezetet, és lehetővé tette a víz behatolását a fehérje



15. ábra. A BPTI amid I sávjára illesztett Gauss komponensek százalékos területarányai a nyomás függvényében. A minta előzőleg egy 0,5 GPa-s nyomáscikluson esett át, amely során a H/D csere megtörtént. Az üres körök az 1,5 GPa nyomás leengedése utáni mérések.

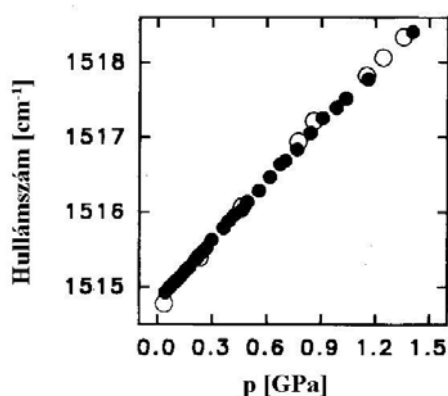
belsejébe. Fontos megjegyezni, hogy a fehérje oldatban van, tehát a nyomás izotróp, a víz bepréselése csak úgy érhető, hogy a bejutó víz olyan üregeket tölt meg, amelyek eddig túl kicsik voltak egy vízmolekulának, de a harmadlagos szerkezet megváltozása lehetővé tette a víz bejutását. Így egy jobban illeszkedő, szorosabban pakolt, azaz kisebb ösztérfogató rendszer alakul ki. A 400 MPa-os ciklus után a fehérje amid I sávja nem volt teljesen reverzibilis, a hélix és a rendezetlen szerkezethez tartozó komponensek tolódtak el, mindegyik az alacsonyabb frekvenciák felé, ami egybeesik a H/D kicserélődéssel járó effektív tömeg növekedéssel.

A 400 MPa-os nyomásciklus után a már teljesen H/D kicserélt fehérjét egy másik, 1,5 GPa-ig tartó nyomásciklusnak vetettük alá (15. ábra). A másodlagos szerkezet változása 800 MPa felett kezdődött. A legnagyobb változás a béta-szerkezethez rendelhető 1627 cm^{-1} -es komponens növekedése volt a rendezetlen szerkezet rovására. Egyidejűleg a minta turbiditása is megnőtt. Ezek az adatok felvetették a fehérjeasszociáció lehetőségét is, amely az infravörös méréseknél szükséges, viszonylag nagy koncentráció miatt lehetséges. (Mai tudásunk alapján ez valószínűtlen, mivel egybehangzó mérések mutatják, hogy az intermolekuláris béta-lemez szerkezetű fehérjeasszociáció nagy nyomás alatt gátolt, ill. az erre jellemző infravörös markervonalak nem a 1627 cm^{-1} -nél, hanem jóval alacsonyabb (1616 cm^{-1}) hullámszámnál találhatók. Másik lehetőségként a röntgenkrisztallográfiai szerkezetben megfigyelhető két nagy huroknak a béta lemezhez való kapcsolódásával lehetett a spektrális változásokat magyarázni. A nyomás teljesen reverzibilisen változtatta meg a térszerkezetet, azaz a nyomás megszüntetése után az infravörös komponensek frekvenciája és relatív intenzitása visszatért az eredeti értékre. A 0,7 GPa és 1,4 GPa közti tartományban a



átalakulást feltételezve a (6) egyenlettel meghatároztuk a fehérje nyomás hatására létrejövő térfogatváltozását, ami $-9,5\text{ ml/mol}$ -nak adódott. Ez az érték jelentősen kisebb a denaturációra jellemző értékeknél, ami ismét a nyomás-denaturáció hiányát támasztotta alá.

Az eredeti kérdésünk az volt, hogy a molekuláris dinamikai számolások túl rövid ideje okozta-e, hogy nem láttak nyomás-denaturációt, vagy tényleg ilyen stabil a fehérje. A kérdésre a válasz az, hogy a fehérjében nagymértékű de reverzibilis elasztikus változások mennek végbe a 0-1 GPa nyomástartományban, de a fehérje nem denaturálódik. Ezeket az elasztikus deformációkat azonban egy elegendően hosszú szimulációnak meg kellett volna mutatnia. Ugyancsak kérdés, hogy a tirozin fluoreszcencia mérések miért nem mutattak változást 1 GPa nyomásnál? Ez utóbbi



16. ábra. A BPTI tirozin rezgésének eltolódása a nyomás függvényében. A fekete körök a nyomás növelésekor, az üresek a nyomáscsökkentés során mért értékeket mutatják.

eldöntésére a fehérje tirozin gyűrűjének rezgéseit is megvizsgáltuk a nyomás függvényében.

A fehérjében négy tirozin van, amelyek aromásgyűrű-rezgései 1515 cm^{-1} -nél figyelhetők meg atmoszferikus nyomáson (Rahmelow és mtsai, 1998). A nyomást növelve teljesen lineáris nyomásfüggést kaptunk (16. ábra). Bár az infravörös rezgések kevésbé érzékenyek a környezet polaritásának változására, mint a fluoreszcencia intenzitás, a teljesen lineáris összefüggés arra enged következtetni, hogy

a tirozinok környezete nem ment át fázisátalakulás-szerű átalakuláson, a tisztán lineáris trend a kötések fizikai kompressziójával magyarázható. A négy tirozin közül három a β -szerkezetben van, amelyik nem bomlik fel a nyomás hatására. Ez lehetett a magyarázata annak, hogy a tirozin fluoreszcencia mérések nem mutattak változást 1 GPa-nál sem.

Végezetül megvizsgáltuk még a szilárd állapotú fehérje összenyomását, ahol 1,5 GPa-ig nem találtunk semmilyen változást az infravörös spektrumban. Ebből a víz szerepének fontosságára következtettünk. Későbbi vizsgálatok is igazolták ezt a tendenciát, ti. hogy a vizet nem tartalmazó biológiai rendszerek (pl. spórák, ld. Sojka és Ludwig, 1994) nyomásstabilitása sokkal nagyobb, mint a nekik megfelelő vizes rendszereké.

Összegezve tehát megállapíthatjuk, hogy a BPTI nyomásindukált reverzibilis elasztikus szerkezetváltozáson megy keresztül, ami a molekula szerkezetét fellazítva a H/D kicserélődést a molekula magjában is lehetővé teszi. A fehérje 0,8 GPa felett konformációs változáson megy keresztül, amely azonban nem eredményezi a molekula denaturációját, és szintén reverzibilis. Mindezek a szerkezetváltozások jól követhetők a továbbfejlesztett Susi és Byler-féle módszerrel.

4.2. A H/D kicserélődés és a konformáció-változások egymásra hatásának vizsgálata 2D korrelációs FTIR spektroszkópiával (T2, P8, P9)

A fehérjék nyomástól függő infravörös spektrumaiban két együttesen megjelenő folyamat kombinálódott: a hidrogén-deutérium kicserélődés és a fehérjegeometria változása. Szétválasztásukra, ill. a két folyamat egymásra hatásának vizsgálatára kétdimenziós korrelációs FTIR spektroszkópiát alkalmaztunk.

A kétdimenziós korrelációs infravörös spektroszkópiát eredetileg a polimerek periodikus elasztikus perturbációja által okozott hatás vizsgálatára és grafikus szemléltetésére fejlesztették ki (Noda, 1990). Később a módszer megalkotója kiterjesztette az eljárást aperiodikus perturbációkra is (Noda, 1993).

Noda szabályokat állított fel arra vonatkozóan, hogy a 2D spektrumokból hogyan lehet kinyerni a spektrális vonalak változásának egymásutániságát. Ezek a szabályok a szimmetrikus és aszimmetrikus 2D spektrum előjeleire alapozva adják meg a sorrendet (részletesen lásd 3.3 fejezet).

Mielőtt a módszert használni kezdtük volna, szimulációkat végeztünk olyan mesterségesen generált spektrumokkal, amelyek vonalai a perturbáció függvényében különböző függvények szerint változtak. Megállapítottuk, hogy Noda szabályai, a folyamatok egymásutániságára a fehérjéknél várható szigmoid típusú, ill. folyamatos változás esetén is igazak.

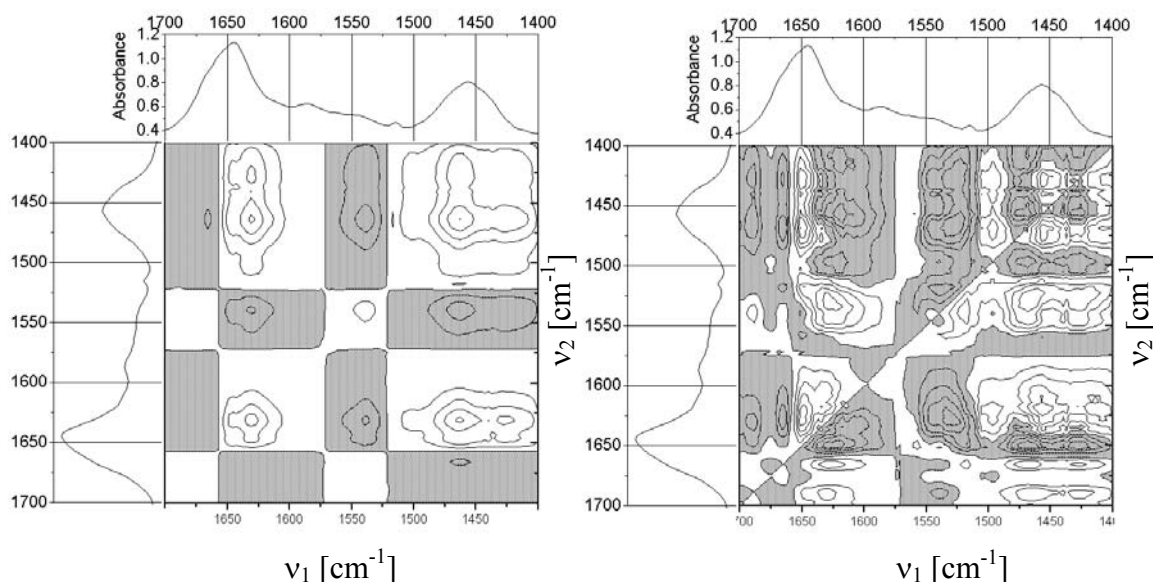
Ezek után alkalmaztuk a módszert az általunk vizsgált fehérjékre azért, hogy azok konformációs és kicserélődési folyamatainak egymásra hatását meghatározzuk. Ehhez szoftvert kellett fejleszteni, mivel akkoriban nem állt rendelkezésre gyári program.

4.2.1. A marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor (BPTI)

A marha hasnyálmirigy tripszin inhibitor választottuk a 2D analízishez, mert ennek előző méréseink szerint viszonylag nagy konformációs stabilitása van, és így választható volt egy olyan széles nyomástartomány, ahol csak az elasztikus konformáció-változások és a hidrogén-deutérium (H/D) kicserélődés megy végbe. A vizsgálathoz az előző fejezetben tárgyalt mérés spektrumait használtuk. Az amid I, II és II' sávokat magába foglaló 1400 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} -es tartományt vizsgáltuk.

A mért 0-1,5 GPa nyomástartományban kiválasztottunk két jellemző szakaszt, a 0-0,3 GPa és a 0,5-0,9 GPa intervallumokat. Mint azt már az előző fejezetből tudjuk, az első intervallumban végbemegy a H/D kicserélődés. Arra voltunk kíváncsiak, hogy ez hogyan csatolódik a másodlagos szerkezet változásához. Vajon a másodlagos szerkezet fellazulása okozza-e a könnyebb kicserélődést, vagy a kicserélődés után változik meg a másodlagos szerkezet stabilitása?

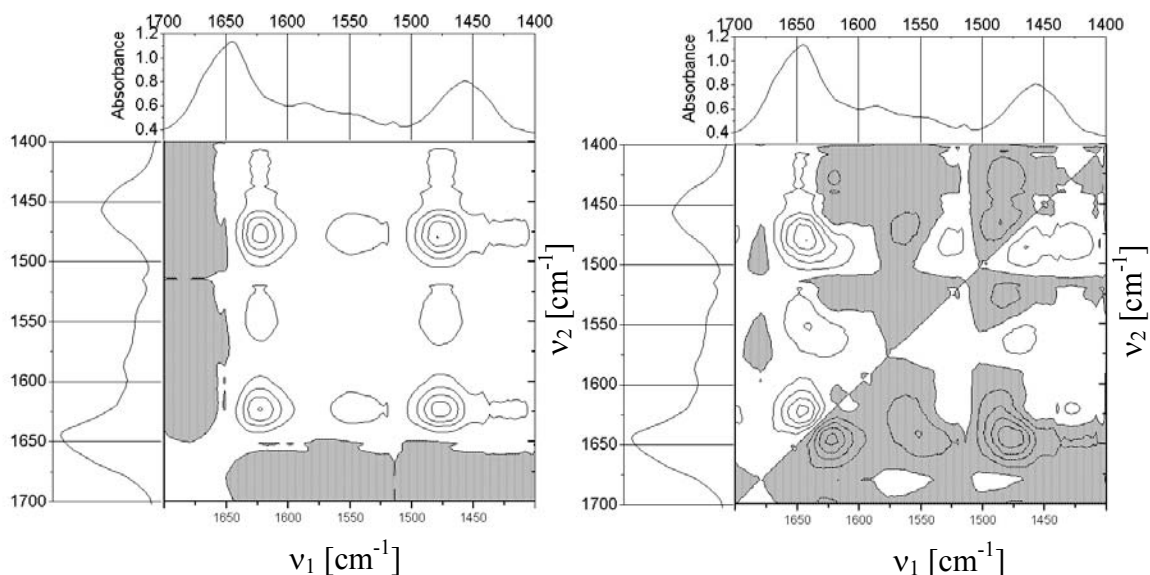
A 17. ábrán láthatók a BPTI 0,03-0,3 GPa tartományban mért 16 spektrumából



17. ábra. A BPTI 0,03-0,3 GPa tartományban mért spektrumaiból számított 2D korrelációs spektrumok. Bal oldalon a szimmetrikus, jobb oldalon az aszimmetrikus ábra. A negatív tartományok szürkére satírozottak. A kétdimenziós ábrák oldalán az atmoszferikus nyomáson mért spektrum látható a könnyebb tájékozódás végett.

számolt 2D korrelációs spektrumok. Megfigyelhető, hogy a 1645 és 1630 cm^{-1} -es amid I, a 1540 és 1500 cm^{-1} -es amid II valamint a 1460 és 1425 cm^{-1} -es amid II' spektrumvonalak mutatnak értékelhető korrelációs csúcsokat. Ezeknél korreláció pozitív, kivéve a 1540 cm^{-1} -es csúcsot, amelynek intenzitása a többiekkel ellenkezően változott. A már részletezett kiértékelési szabályok felhasználásával (ld. 3.3 fejezet) a változások sorrendiségére a 1640 (első) > 1540 > 1500 > 1460 > 1425 > 1630 cm^{-1} (utolsó) sorrend adódott, melyből arra következtettünk, hogy a másodlagos szerkezet deformációja (1645 cm^{-1}) szükséges a H/D kicserélődés megindulásához. A nyomásciklust újra megismételve a 2D spektrumokon a kicserélődésre jellemző kereszt csúcsok (pl. $\nu_1=1645 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_2=1550 \text{ cm}^{-1}$) hiányoznak, amiből arra következtettünk, hogy a H/D kicserélődés már az előző ciklusban irreverzibilis módon végbement. A fehérjeszerkezet változásai azonban reverzibilisek voltak, az elasztikus deformációt mutató csúcsok jelen vannak a második ciklusban is. Ezáltal a kicserélődés és az elasztikus konformáció-változás spektrális hatásait sikerült szétválasztani.

A nyomás további növelése során a 0,5-0,9 GPa tartományban már nem találtunk



18. ábra A BPTI 0,5-0,9 GPa tartományban mért spektrumaiból számított 2D korrelációs spektrumok. Bal oldalon a szimmetrikus, jobb oldalon az aszimmetrikus ábra. A negatív tartományok szürkére satírozottak.

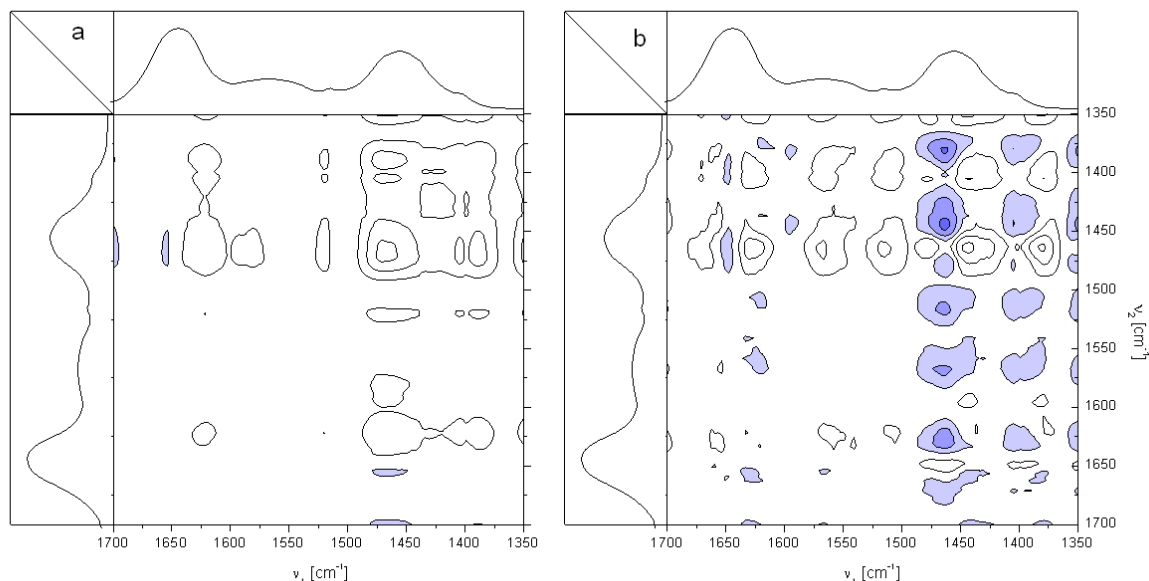
szignifikáns kicserélődésre utáló nyomot (18. ábra). Az erősen korreláló amid I és amid II' vonalak a másodlagos szerkezet további változását mutatják a már teljesen deuterált fehérjében.

Összegezve azt mondhatjuk, hogy a 2D korrelációs analízissel sikerült szétválasztani a BPTI H/D kicserélődési és elasztikus szerkezetváltozási jelenségeit. Megállapítottuk, hogy a kicserélődést egy kezdeti konformáció-változás indítja el, majd a H/D kicserélődés további konformációs átrendeződést indukál.

4.2.2 A szója lipoxigenáz

A 2D korrelációs spektroszkópiát ezután egy olyan fehérjére alkalmaztuk, ahol a vizsgált nyomástartományban nemcsak elasztikus, hanem konformációs változások (denaturáció) is várhatóak voltak. A szója lipoxigenáz a BPTI-vel ellentétben egy kimondottan nagy fehérje, amely 839 aminosavból áll, 22 alfa-hélixet és egy 8 polipeptid szakaszból álló béta-lemezes szerkezetet tartalmaz (Gaffney, 1996, Minor és mtsai, 1996). Mivel az enzim az élelmiszerek lebontási folyamataiban vesz részt (Hendrickx és mtsai, 1998), nyomás-inaktiválását egy élelmiszeripari EU projekt keretében vizsgáltuk. A nyomástartományt három részre osztottuk, a denaturációhoz kapcsolódó konformációs változásokat még nem mutató 0,23-0,44 GPa-os szakaszra, a konformációs változások tartományára (0,45-0,9 GPa) és a már denaturált állapotú polipeptidláncot tartalmazó felső 0,85-1,06 GPa tartományra. A felosztás alapja az amid I sáv maximumának a nyomás függvényében történő szigmoid függvényt követő eltolódása, amelynek átmeneti pontja a 0,65 GPa-nál volt (Heinisch és mtsai 1995).

Az alsó nyomástartományban (0,23-0,44 GPa) csak nagyon kis szerkezetváltozásra utáló jelet láttunk (19. ábra), ami az amid II' sáv 1437 cm^{-1} -es sávjával korrelál. A korrelációs spektrumok amplitúdói itt egy nagyságrenddel kisebbek, mint a 0,47-0,90 GPa tartományban (20. ábra). Az alacsony nyomástartományban megjelenő amid I és amid II' keresztcsúcsok az amid II jelek hiányával együtt azt mutatják, hogy a már H/D kicserélődésen átesett fehérjeszakaszok konformációja változik kis mértékben. A mérés előtt ugyanis a minta kb. 15 órán (egy éjszakán) át D_2O -ban (pontosabban pD 7.8 Tris pufferben) volt feloldva, megteremtve ezzel annak a lehetőségét, hogy az oldószerrel érintkező hidrogének kicserélődjenek. A 1620 cm^{-1} -nél megjelenő

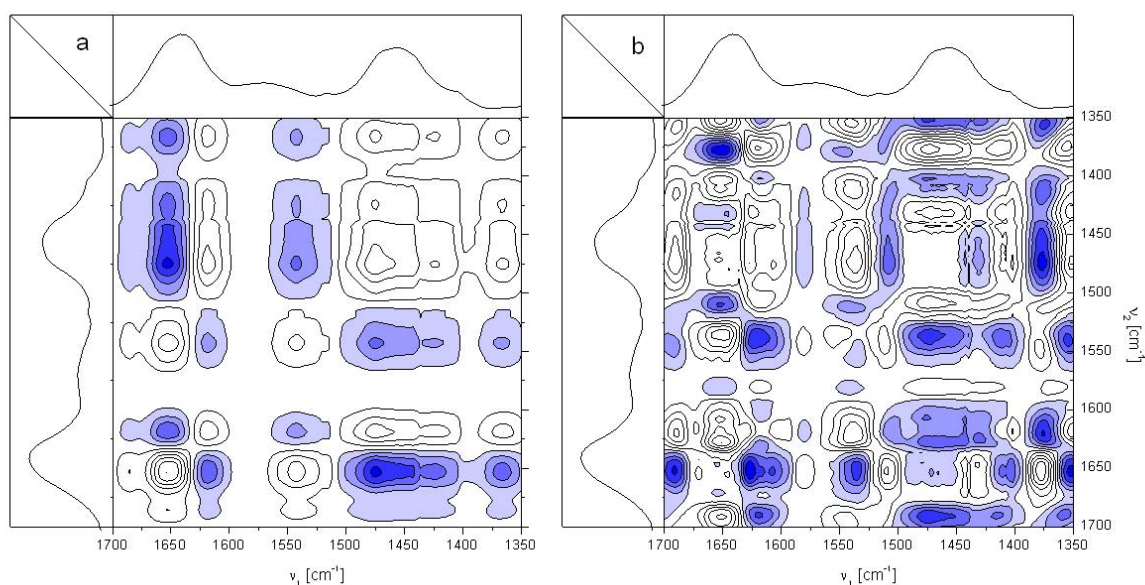


19. ábra. A szója lipoxigenáz 0,23-0,44 GPa között mért infravörös spektrumaiból számított 2D korrelációs spektrumok. Bal oldalon a szimmetrikus, jobb oldalon az aszimmetrikus ábra. A felső és bal oldali téglalapokban a referencia spektrum abszorbananciája van ábrázolva a ν_1 ill. ν_2 függvényében. A negatív tartományok kékkel vannak jelölve.

keresztcsúcsok az intermolekuláris kölcsönhatások megváltozására is utalnak. Ismeretes ugyanis, hogy a fehérjék aggregációját a nyomás gátolja (Silva és Weber 1988, Silva és mtsai, 2001). Figyelemre méltó a lipoxigenáz alacsony nyomású, és a BPTI nagy nyomású szimmetrikus 2D ábráinak hasonlósága. Mindkét esetben a már H/D kicserélt szerkezet deformációja megy végbe további H/D kicserélődés nélkül. A lipoxigenáz esetében már alacsony nyomáson van olyan része a proteinnek, ahol a kicserélődés végbement, ami arra utal, hogy a térszerkezet egy része kevésbé merev, mint a BPTI-nél, és így a fehérje egy része már atmoszferikus nyomáson kicserélődik, míg a merev BPTI esetében ehhez a kicserélődéshez is nagy nyomásra van szükség.

A legnagyobb amplitúdójú változások a 2D spektrumokon is a 0,45-0,9 GPa nyomástartományban voltak. Fehérjeszerkezet-változásra és H/D kicserélődésre utaló komponensek egyaránt megfigyelhetők voltak a szinkron és aszinkron 2D spektrumokon. A natív struktúrához tartozó másodlagos szerkezeti komponensek

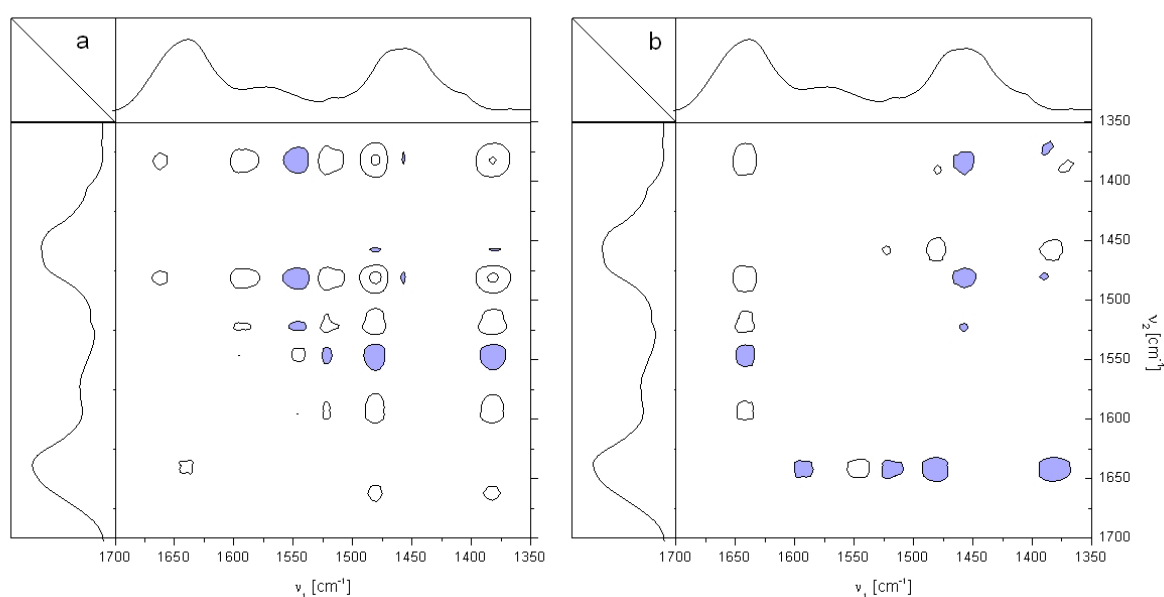
csökkenését a 1655 cm^{-1} -es csúcs csökkenése mutatja, mely az alfa-helikális struktúra eltűnését jelenti. Ezzel korrelál az amid II (1541 cm^{-1}) sáv csökkenése, és mindkettővel antikorreálanak az egyidejűleg növekvő amid II' komponensek (1475 és 1424 cm^{-1}). A 2D analízis által szolgáltatott sorrend a következő volt: 1620 (első) $> 1475 > 1655 > 1540\text{ cm}^{-1}$ (utolsó). Mivel a 1620 cm^{-1} -es komponens már az előző nyomástartományban is jelen volt, nem meglepő, hogy ennek a változása történt először. Ennek köszönhető az is, hogy az amid II' sáv előbb jelenik meg, mint az amid II, pedig ezek megjelenését egyszerre várnánk. A fehérje szerkezetét alapvetően befolyásoló 1655 cm^{-1} -es sáv az amid II és II' változások közé ékelődik, ami azt mutatja, hogy a másodlagos szerkezet változása nagyon szoros korrelációban van a kicserélődéssel.



20. ábra. A szója lipoxigenáz $0,47$ - $0,90\text{ GPa}$ között mért infravörös spektrumaiból számított 2D korrelációs spektrumok. Bal oldalon a szimmetrikus, jobb oldalon az aszimmetrikus ábra. A negatív tartományok kékkel jelöltek.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a fehérjének van egy belső magja, amelyben a helikális szerkezet dominál, és amely annyira kompakt, sűrűn hajtogatott szerkezetű, hogy az amid hidrogének a fehérjének ebben a részében atmoszferikus nyomáson natív állapotban még 15 óra alatt sem képesek kicserélődni. Erre csak a másodlagos szerkezet széttekeredésekor kerül sor.

A legfelső nyomástartományban, ahol a fehérje már denaturált állapotban van, a 2D spektrumokon megjelenő gyenge csúcsokból (21. ábra) azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a széttékeredett fehérjében nyomokban még mindig jelen vannak bizonyos másodlagos szerkezeti komponensek. Ebben a tartományban a maximális amplitúdójú keresztcsúcsok még a 0,23-0,44 GPa tartományban találtnál is egy kettes faktorról kisebbek, ami nagyon kis szerkezeti átalakulásra utal. A denaturált fehérjében nyomokban meglévő másodlagos szerkezetek részarányának további



21. ábra. A szója lipoxigenáz 0,85-1,06 GPa között mért infravörös spektrumaiból számított 2D korrelációs spektrumok. Baloldalon a szimmetrikus, jobb oldalon az aszimmetrikus ábra. A negatív tartományok kékkel jelöltek.

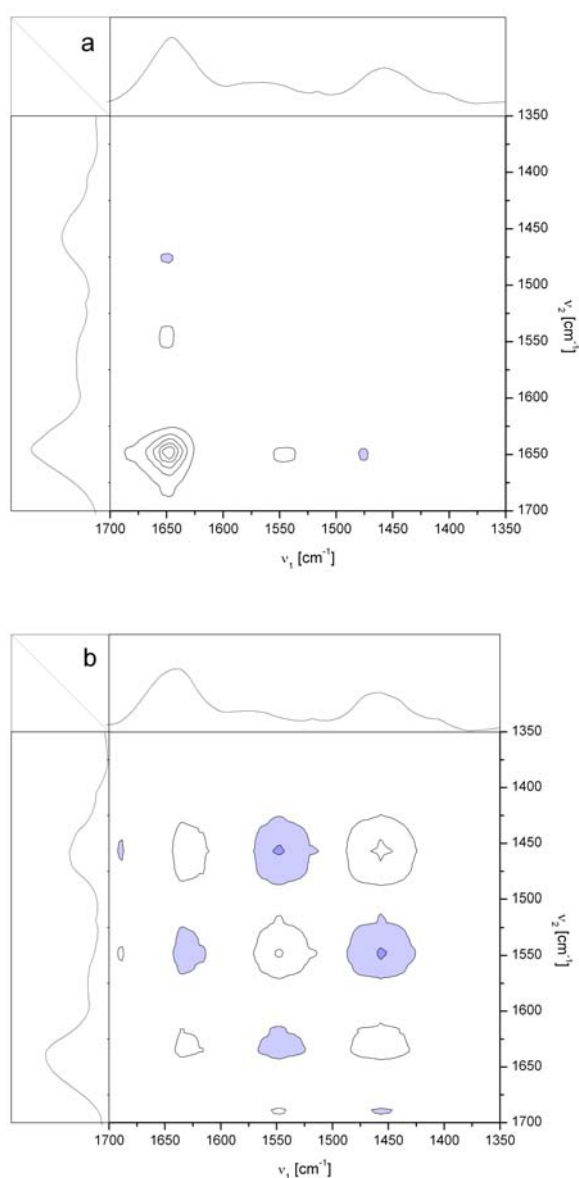
nyomásnövekedés hatására történő csökkenését és a rendezetlen konformáció további növekedését kaptuk a 2D spektrumok alapján.

A H/D kicserélődés időtől való függését is analizáltuk a 2D korrelációs spektrumok segítségével. 0,52 és 0,73 GPa nyomásokon végeztünk kinetikai méréseket, nyomásugrás után követve a kinetikát. A nyomást a gyémánt cellában úgy növeltük, hogy ez ne vezessen jelentős adiabatikus melegeedéshez. A gyémánt jó hővezető-képessége és a minta kis térfogata miatt ez biztosított volt. A nyomásugrást követő 2 órában az idő függvényében felvett spektrumokból számoltuk ki a 2D korrelációs spektrumokat (22. ábra). Most a nyomás helyett az időt tekintettük a „perturbáló

paraméternek” (ld. 3.3. fejezet). A kinetikai 2D spektrumok alapján megállapítottuk, hogy a 0,52 GPa-on már megindulnak konformációs változások és a 2D spektrumokon ezek a konformációs változások dominálnak. Jelentős kicserélődési effektust azonban nem tapasztalunk a spektrumokon. Ebből arra lehet következtetni, hogy először a fehérje kevésbé rigid, a víz által elérhető doménjei szenvednek konformáció-változást. A 2D szinkron spektrumban a 0,73 GPa-os mérésnél megjelenő kereszt-csúcsok arra utalnak, hogy a kicserélődés és a konformáció-változás ebben a nyomástartományban korrelált. Ez megint azt a korábbi megállapításunkat erősíti meg, hogy a fehérjének van egy belső, nem flexibilis magja, amely csak a kitekeredés után érhető el a víz számára.

Összegezve tehát a 2D korrelációs

analízissel megállapítható, hogy a fehérjének van egy olyan része, amely normál körülmények között is elérhető az oldószer számára, itt a H/D kicserélődés 15 óra alatt teljesen lezajlik. Létezik azonban egy belső merevebb mag, amely csak a denaturációval egyidejűleg válik elérhetővé, és ebben a H/D kicserélődés csak a kitekeredéssel együtt járó konformációs változásokkal együtt zajlik le. Méréseink szerint a merev maghoz főleg hélix szerkezet tartozik.



22. ábra. A szója lipoxigenáz 0,52 (a) ill. 0,73 (b) GPa nyomáson az idő függvényében mért infravörös spektrumaiból számolt 2D szimmetrikus korrelációs spektrumok. A negatív tartományokat kék szín jelöli.

4.3. A nyomás-denaturácót követő újragombolyodás során intermediér állapotok keletkeznek, melyeknek fokozott aggregációra való hajlamuk van. (T3, P7, P10)

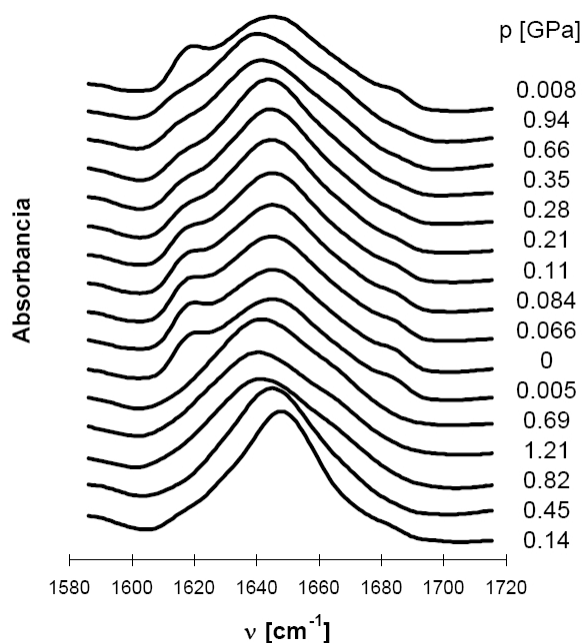
Az eddigiekben a fehérjék összenyomásakor fellépő effektusokat tanulmányoztuk. Most a nyomás-denaturációt követő, a denaturációs nyomásciklus után kialakuló fehérjestruktúrákat vizsgáljuk. Tulajdonképpen ezek egyfajta (re)folding vizsgálatok, ahol a nagy nyomást, mint denaturáló ágenszt használjuk.

4.3.1. Lószív mioglobin

Kísérleteinkhez a lószív mioglobint használtuk, amit pD 7,6 Tris pufferben 5 mM koncentrációban oldottunk. A lószív mioglobin egy viszonylag kisméretű, 153 aminosavat tartalmazó, jól karakterizált fehérje, elérhető volt a röntgenkrisztallográfiás szerkezete is (Evans és Brayer, 1990, PDB adatbázis 1YMB azonosítójú szerkezet). Korábbi méréseink alapján (Smeller és mtsai, 1996) az általunk használt (a továbbiakban csak mioglobinként emlegetett) lószív mioglobin nyomás-denaturációja 0,6 és 0,7 GPa nyomások között zajlik le, az átalakulás középpontja 0,66 GPa-nál van, a térfogatváltozás $-72 \text{ cm}^3/\text{mol}$. A nyomásdenaturált fehérje infravörös spektruma alapján – a 1616 cm^{-1} -es és 1685 cm^{-1} -es sávok hiányából – arra következtettünk, hogy nagy nyomáson nem keletkeznek intermolekuláris β -szerkezetű aggregátumok, ezért remélhető volt a nyomás-denaturáció reverzibilitása, azaz a fehérje újragombolyodása a nyomás megszüntetése után. A mioglobinton két egymás után végrehajtott nyomásciklus során mért legjellemzőbb infravörös spektrumokat mutatja a 23. ábra. Itt a hőmérséklet 45°C volt, ami nagyobb a szobahőmérsékletnél, sőt a testhőmérsékletnél is, de jelentősen alacsonyabb, mint a fehérje denaturációs hőmérséklete: 71°C .

Atmoszferikus nyomáson a 1650 cm^{-1} -es sáv dominál a spektrum felbontásában, ami egybeesik a krisztallográfiái adatokkal, amely szerint a mioglobin szerkezete túlnyomórészt helikális szerkezetű. A nyolc hélix közül csak a C-hélix (a fehérje N terminálisától számított harmadik hélix) 3_{10} szerkezetű, a többi α -hélix. Ezek összesen 130 aminosavat foglalnak magukba, ami a szerkezet 85%-a.

Nagy nyomás ($> 0,8$ GPa) hatására a spektrum eltolódik és kiszélesedik, a 1640 cm^{-1} -es sáv dominál, ami a rendezetlen szerkezetre utal.



23. ábra. A lószív mioglobinnél 45°C -on, két egymást követő nyomásciklus során mért infravörös spektrumai (amid I sáv). A jobb oldalon a görbékhez tartozó nyomás látható. Az időben első spektrum a legalsó. A spektrumok dekonvolválta, amely 1,5-szörös felbontásnövelést eredményezett.

Az első nyomás-denaturációt követően az újragombolyodás során a nyomást $0,2$ GPa alá csökkentve az infravörös spektrumon megjelentek azok az jellegzetes oldalsávok, (1616 cm^{-1} és 1685 cm^{-1} -nél) amelyek intermolekuláris kölcsönhatások megjelenését mutatják. Ezek a sávok a hődenaturált fehérjék esetén tipikusak, amikor a fehérje aggregálódik. Ezeket az aggregátumokat intermolekuláris béta-lemezre jellemző hidrogén-híd kötések stabilizálják. A 1616 és 1685 cm^{-1} -nél megfigyelhető spektrumvonal-pár tehát a hődenaturálthoz hasonló

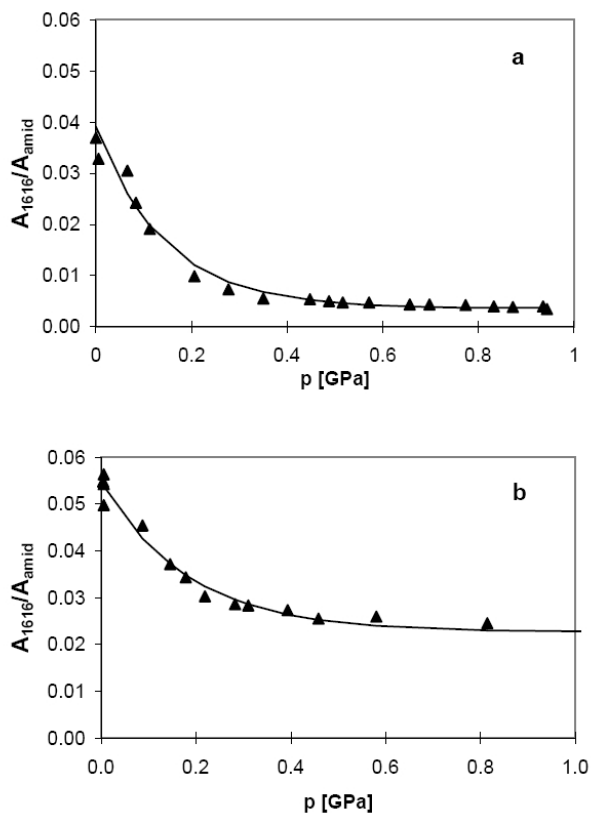
szerkezetű aggregált fázis megjelenésére utal (Clark és mtsai, 1981, Ismail és mtsai, 1992, Chirchadse és Newskaya, 1976). Ugyanilyen aggregátumok jelentek meg a nyomásciklus után, amikor a mérést 60°C -on végeztük, de nem lehetett aggregátumokat megfigyelni szobahőmérséklet közelében (27°C -on) és alacsonyabb hőmérsékleten (5°C) sem. Szeretném hangsúlyozni, hogy az aggregátumokat jellemző infravörös oldalsávok nem a nyomás hatására, nem a nyomás alatt, hanem csak a nyomás megszüntetése során, az atmoszferikus nyomáshoz közeledve alakultak ki. Az oldalsávok intenzitása (a teljes amid I sávhoz viszonyított területe) 6-szor ill. 4-szer kisebb (45°C -on ill. 60°C -on), mint az atmoszferikus nyomáson hődenaturált fehérje oldalsávjainak intenzitása. Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a 45 és 60°C -on keletkező aggregátumok kevésbé stabilak, mint a

hődenaturáció után keletkezettek. Az oldalsávok intenzitása ugyanis arányos az aggregátumot stabilizáló intermolekuláris hidrogénhid kötések számával. Ebből az is következik, hogy a nyomásciklus után atmoszferikus nyomáson keletkező fehérjeszerkezet feltekeredettséget tekintve a natív és a denaturált közé esik. A natív szerkezet ugyanis nem képes intermolekuláris kötődésekre, a teljesen denaturált fehérjében pedig sokkal több olyan amid oxigén van, amelyik nem vesz részt intramolekuláris hidrogénhidban, így képes az aggregációt stabilizáló intermolekuláris hidrogénkötést képezni. Eszerint a nyomás-denaturációs ciklus után 45 és 60 °C-on intermedier fehérjeszerkezet alakul ki, amely atmoszferikus nyomáson aggregációra hajlamos.

Ezt a gyengén aggregált intermedier szerkezetű mioglobint újabb nyomásciklusnak alávetve azt találtuk, hogy az aggregátumok reverzibilis módon disszociálnak (ld. a 23. ábrán a legfelső tíz spektrumot).

A 1616 cm^{-1} -es Gauss-komponensnek a második nyomásciklus spektrumaiból számolt területét mutatja a 24. ábra. Látszik, hogy az intermolekuláris kötések száma a nyomás hatására csökken, de nem tűnik el teljesen. Ebből arra következtethetünk, hogy a kialakult aggregátumunk nem volt teljesen homogén, hanem legalább

egy nyomásstabil és egy nyomásérzékeny komponenst rejt magában. Magasabb hőmérsékleten, (60°C-on) a stabil komponens aránya nagyobb volt. A nyomás hatására történő disszociáció reverzibilis, ugyanis a második nyomásciklus után újra



24. ábra A mioglobin 1616 cm^{-1} -es sávjának relatív területaránya a második nyomásciklus alkalmával a) 45°C-on, b) 60°C-on.

kialakul az intermolekuláris antiparallel β -lemez szerkezetű hidrogénhidakkal stabilizált aggregátum.

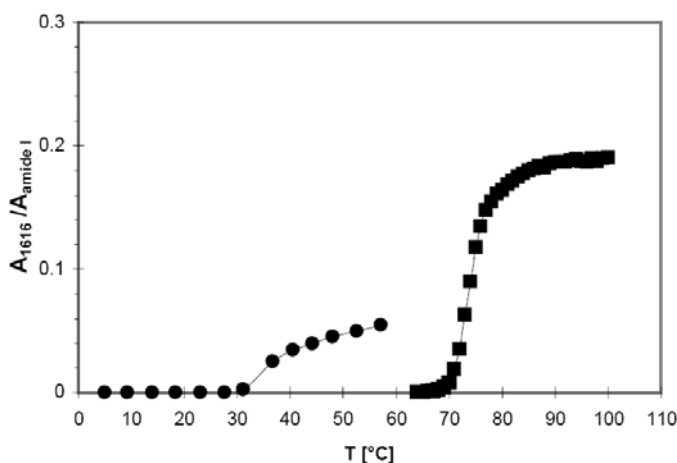
Az aggregátumra jellemző komponens területe az egész amid I sáv területének 4 ill. 5,5 %-a 45°C-on ill. 60°C-on. Ez azt jelenti, hogy amennyiben minden fehérjelánc aggregátumot képezne, fehérjénként 5-8 aminosav venne részt az aggregátumot stabilizáló intermolekuláris kötésekben. Ez nagyon kevésnek tűnik, hiszen ahhoz, hogy összefüggő aggregátum jöjjön létre, egy polipeptid láncnak kettőnél több másik láncsal kell kapcsolatot tartania. Sokkal valószínűbb, hogy az aggregátumot stabilizáló antiparallel β -szerű hidrogénhidak száma fehérjénként a fenti érték többszöröse, és a fehérjék csak egy része tartozik az aggregátumhoz. Ennek bizonyítására még visszatérek.

Egy nagyon egyszerű modellel, mely szerint az aggregátumról egyenként leváló fehérjék egyensúlyban vannak az aggregátummal, az aggregációs folyamat térfogatváltozására a $\Delta V = 18,3 \pm 1,6$ ill. $15,0 \pm 1,4$ cm³/mol értékeket kapjuk 45 ill. 60°C-on. Bár az illesztés hibái 10% körüliek, a modell egyszerűsége miatt a fenti értékeket csak becslésnek tekinthetjük.

Ez (abszolút értékben) jelentősen kisebb a nyomás-denaturációnál mérhető térfogatváltozásnál, ami -72 cm³/mol volt. Fontos megjegyezni, hogy az aggregáció és a denaturáció különböző szerkezetváltozást vonnak maguk után, ezért a térfogatok aránya nem értelmezhető az aggregációban résztvevő aminosavak hányadaként.

Mivel a szobahőmérsékleten végrehajtott nyomásciklus után nem keletkezett aggregátum, felmerült a kérdés, hogy ez kinetikai vagy szerkezeti okokból következett-e be. Két lehetőség van: az egyik szerint keletkezett intermedier komponens a refolding során, csak ez nagyon lassan aggregálódik, ill. az aggregáció és a natív szerkezet újragombolyodása vetélkedő folyamataiból az újragombolyodás kerül ki győztesen. A másik lehetőség szerint az intermedier szerkezet keletkezéséhez megemelkedett hőmérsékletre van szükség. Ennek eldöntésére a szobahőmérséklet közelében és alatta (27°C és 5°C-on) nyomás-denaturációs cikluson átesett fehérjét már az atmoszferikus nyomáshoz közeli nyomáson[‡]

[‡] Technikai okokból a nyomást nem lehet egészen 1 bar-ra csökkenteni, mert a nyomáscella zárása ekkor nem lenne biztosított. A nyomást tipikusan 40 MPa érték környékére (30 és 50 MPa közé)



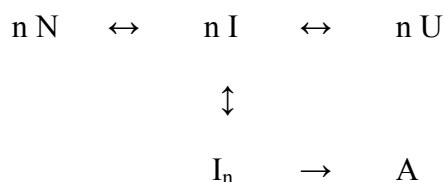
25. ábra. A mioglobín 1616 cm⁻¹-es sávjának relatív területe nyomásciklust követő (●) és a nyomáscikluson át nem esett (■) fehérje melegítése során.

területe kisebb, mint a hődenaturáció esetén. A 45 °C-on mért érték megfelel a 45°C-on nyomáskezelt fehérje esetén mért értéknek.

Kérdésünkre tehát egyértelmű választ kaptunk azzal, hogy a nem teljesen felgombolyodott intermediér szerkezetek alacsonyabb hőmérsékleten is keletkeznek a nyomásciklus után, csak az aggregációjuk gátolt 30°C alatt.

Megjegyzendő, hogy a 1616 cm⁻¹-es sávnak a 40-60°C tartományban a denaturálthoz (90-100°C) képest mért kisebb intenzitása megerősíti azt a korábbi feltételezésünket, hogy a 45 és 60°C-on végzett méréseinknél nem volt minden fehérje az aggregátum része.

A méréseinkben megjelenő fehérje-konformáció átalakulásokat a következő sémával értelmeztük:

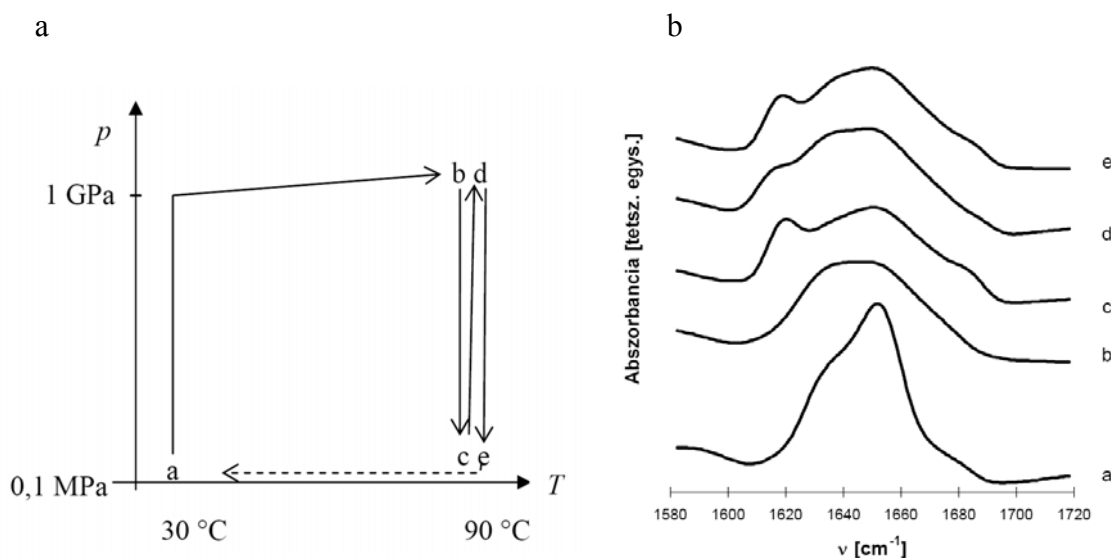


sikerült levinni ezekben a kísérletekben anélkül, hogy a minta kifolyt volna. Ezt fogom úgy hívni, hogy az „atmoszferikus nyomás közelében”.

ahol N jelöli a natív, I az intermedier, U a széttekeredett (unfolded), A az irreverzibilisen aggregált állapotot, I_n pedig olyan, n fehérjeláncból álló reverzibilis aggregátum, amely méréseink szerint nyomással disszociálható. Ez a séma jól magyarázza eddigi méréseinket, miszerint a natív állapotból kiindulva a fehérje nyomás hatására intermedier állapoton keresztül denaturálódik, de a nyomás után a refolding időigénye miatt a fehérje hosszabb időt tölt el az intermedier állapotban, és ezért van ideje aggregálódni (I_n). Az asszociátum egy része tovább stabilizálódik, és nyomásálló aggregátum válik belőle (A).

Végül egy nyomás-hőmérséklet kombinált ciklust végeztünk, ennek az eredményét mutatja a 26. ábra. A fehérjét 30 °C-on nyomásdenaturáltuk, majd 90 °C-ra, a denaturációs hőmérséklet fölé fűtöttük, és ezen a hőmérsékleten a nyomást atmoszferikusra csökkentettük, majd egy nyomásciklus után a mintát atmoszferikus nyomás közelében hűtöttük szobahőmérsékletre (26. a ábra).

A 26. b ábra spektrumai mutatják, hogy a fehérje aggregációját a nagy nyomás sikeresen gátolja 90 °C-on is, ami egyébként jóval a denaturációs hőmérséklet felett van. A nagy nyomás megszüntetése ugyanúgy indukálta az aggregációt, mint 45 és



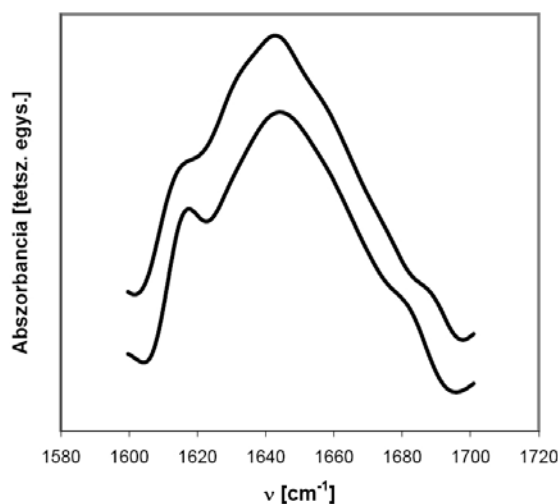
26. ábra. A mioglobinton végrehajtott nyomás-hőmérséklet ciklus: a) A p - T ciklus sematikus ábrája. b) A mioglobin infravörös spektruma (amid I sáv) a nyomás-hőmérséklet ciklus alatt. A görbék melletti betűk az A panelen látható p - T értékekhez tartoznak. (a: 0,1MPa,30°C, b: 1,2 GPa, 90°C, c:<50MPa, 90°C, d: 1GPa, 90°C, e: 50MPa, 90°C)

60 °C-on. Ez az aggregátum szintén részben disszociálódott nagy nyomás alatt, a 24. ábrához hasonló nyomásfüggéssel. A 90°-on illesztett exponenciális függvényből számolható térfogatváltozás: $\Delta V = 7,3 \pm 0,4 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Ezt az értéket, és a már említett aggregációs ΔV -ket a hőmérséklet függvényében ábrázolva, egyenest kapunk, melynek a meredeksége $-0,25 \pm 0,01 \text{ cm}^3/(\text{mol} \cdot \text{K})$, amit az aggregált és az intermedier konformációjú fehérjék hőtágulási együtthatóinak különbségéként lehet értelmezni.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a nyomás-denaturációt követő újragombolyodás során a mioglobinnal intermedier szerkezet alakul ki. Ez a félig feltekeredett fehérje-konformáció atmoszferikus nyomáson már a denaturációs hőmérséklet alatt aggregátumokat képez, ezek az aggregátumok azonban nagy nyomásra részlegesen disszociálnak. A kísérleteinkben tapasztalt konformációváltozásokat egy egységes sémában foglaltuk össze, amellyel sikerült értelmezni a különböző nyomás- és hőmérsékletviszonyok között kialakuló fehérje-konformációkat.

4.3.2. Szója lipoxigenáz

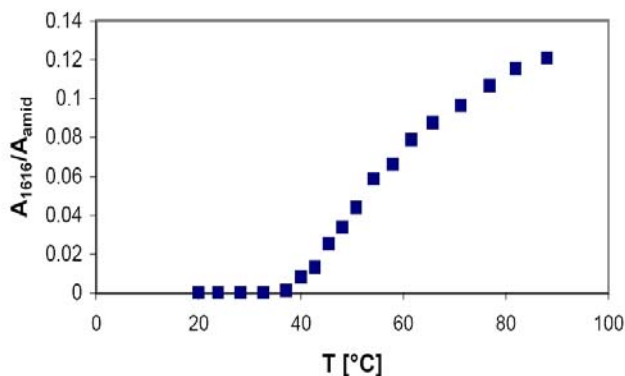
A mioglobinnal ellentétben a lipoxigenáz nem csak helikális struktúrákat tartalmaz, hanem több kisebb béta-lemezt is (Gaffney, 1996, Minor és mtsai, 1996) (ld. 3.5. fejezet, 10. ábra). Ezért volt különösen érdekes, hogy a mioglobinnál tapasztalt (nyomás-denaturációs ciklus hatására kialakuló) intermedier szerkezetek a lipoxigenáz nyomásciklusa után is megjelennek-e, azaz, hogy egyedi, a mioglobinnal jellemző tulajdonsággal állunk-e szemben, vagy a



27. ábra. A szója lipoxigenáz dekonvolált amid I sávja 55°C-on. Alul a denaturáló nyomásciklus után atmoszferikushoz közeli nyomáson mért spektrum, felül a második nyomásciklus során 1,6 GPa-n mért spektrum (függőlegesen eltolva).

fehérjék egy általános tulajdonságát ragadtuk meg?

A 27. ábra mutatja a lipoxigenáz amid I sávját az 55°C-on végzett denaturáló nyomásciklus után atmoszferikushoz közeli nyomáson, ill. a második nyomásciklus



28. ábra. A szója lipoxigenáz enzim 1616 cm⁻¹-es sávjának relatív területe a 20°-on végrehajtott denaturáló nyomásciklus után, a hőmérséklet függvényében.

során 1,6 GPa nyomáson.

Látható, hogy az aggregációra hajlamos intermedier konformáció itt is jelen van, amit a gyenge aggregátumok megjelenése mutat. Az 55°C jóval a denaturációs hőmérséklet (68°C, Heinisch és mtsai 1995) alatt van. A mioglobinhoz hasonlóan az aggregátum nagy nyomás hatására itt is részlegesen disszociálódik.

A 20°C-on nyomásdenaturált és újrateremtett lipoxigenázt a hőmérséklet függvényében vizsgáltuk a mioglobinhoz hasonlóan. A 28. ábra mutatja az intermolekuláris antiparallel béta szerkezetre jellemző 1616-os sáv területét a hőmérséklet függvényében.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a mioglobinhoz hasonlóan a lipoxigenáz esetén is keletkeznek aggregációra hajlamos, részlegesen feltekeredett konformációjú fehérjeláncok, amelyek intermolekuláris béta típusú hidrogénhidakkal stabilizált aggregátumot hoznak létre már 30 °C-al a denaturációs hőmérséklet alatt.

4.4. Fehérje-kompresszibilitás mérése nagy nyomáson fluoreszcencia vonal-keskenyedés méréssel. (T4, P11)

A fehérjék működésében a szerkezet dinamikájának, azaz a fluktuációknak alapvető jelentőségük van. A már említett fluktuáció-disszipáció tétel kimondja, hogy a térfogati fluktuációk és a kompresszibilitás között szoros kapcsolat van. Ezért a

kompresszibilitás mérésével a fehérje működését meghatározó dinamikába kaphatunk bepillantást.

Olyan módszert fejlesztetünk ki, amelynek a segítségével a fehérje-kompresszibilitás spektroszkópai módszerrel mérhető, anélkül, hogy speciális és nagyon drága, kis vonalszélességű lézerre lenne szükség. A módszert először a dimetil-szulfoxid mátrixba ágyazott magnézium-mezoporfirin rendszeren próbáltuk ki, majd a módszert a magnézium-mezoporfirinnel helyettesített tormaperoxidáz kompresszibilitásának meghatározására használtuk.

4. 4 1. A kompresszibilitás számolása FLN spektroszkópai mérésekből. Elméleti eredmények.

A spektrális lyukégetés technikájára kidolgozott elméletet (Laird és Skinner, 1989) fejlesztettem tovább olyan módon, hogy a fluoreszcencia vonalkeskenyedési (FLN) spektroszkópiával meghatározott, sokkal kisebb felbontású mérések eredményeiből, azaz az inhomogén eloszlásfüggvény maximumának nyomás-eltolódásából is meghatározható legyen a fehérje kompresszibilitása (a vákuum-frekvencia ismeretében).

A Laird-Skinner elmélet szerint egy kromofór molekula ν_0 frekvenciánál fellépő spektrumvonala p nyomás hatására ν_p értékre tolódik el a következő egyenlet szerint (ld. a 2. 3. 3. fejezet (11) egyenletét):

$$\nu_p - \nu_0 = 2 (\nu_0 - \nu_{\text{vac}}) \kappa p \quad (21)$$

ahol ν_{vac} a kromofór átmeneti frekvenciája külső hatás nélkül (azaz vákuumban), κ pedig a kromofór környezetének kompresszibilitása.

Az FLN spektroszkópai mérésekben azonban nem egy egyedi molekula spektrális vonalát határozzuk meg, hanem egy inhomogén környezetben levő kromofórsokaság eloszlásfüggvényét, az inhomogén eloszlásfüggvényt (IDF). A 2.3.1. fejezetben bevezetett dN/dE inhomogén eloszlásfüggvényt a $dN/d\nu$ alakban írjuk fel[§]. Mivel a

[§] Az inhomogén eloszlásfüggvény matematikai precizitással tulajdonképpen sűrűségfüggvény. (A matematikusok az $N(\nu)$ függvényt neveznék eloszlásfüggvénynek, ahol $N(\nu)$ azon kromofórok száma, amelyek átmeneti frekvenciája kisebb mint ν .) Mivel az irodalomban a $dN/d\nu$ -re az eloszlásfüggvény (és nem a sűrűségfüggvény) elnevezés terjedt el, én is ezt fogom használni.

kromofór környezete inhomogén, ezért nulla nyomáson az inhomogén környezet által okozott $\nu_0 - \nu_{vac}$ ún. „oldószer eltolódás” sem azonos minden molekulára. Így a nyomás nélkül (de mátrixban) mérhető ν_0 frekvencia az inhomogén eloszlásfüggvényt követi. Feltételezve, hogy ez Gauss-görbe:

$$\left. \frac{dN(\nu)}{d\nu} \right|_{\nu_0} = N_0 G(\nu_0) = \frac{N_0}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(\nu_0 - \nu_{00})^2}{2\sigma^2}} \quad (22)$$

ahol $N(\nu)$ azon kromofórok száma, amelyekre az átmeneti frekvencia ν -nél kisebb, ν_{00} az eloszlás várható értéke, σ pedig a szórása. Ha a mintát nyomás alá helyezzük, minden egyes ν_0 frekvencia eltolódik egy, a Lair-Skinner elméletből ismert függvény szerint:

$$\nu_p = f_p(\nu_0) = \nu_0 + 2(\nu_0 - \nu_{vac})\kappa p \quad (23)$$

Ebből a p nyomáshoz tartozó eloszlásfüggvény kiszámolható (ld. pl. Korn és Korn 1975):

$$\left. \frac{dN(\nu)}{d\nu} \right|_{\nu_p} = G(f^{-1}(\nu_p)) \left| \frac{df^{-1}(x)}{dx} \right|_{x=\nu_p} \quad (24)$$

ahol f_p^{-1} az f_p függvény inverz függvénye:

$$\nu_0 = f^{-1}(\nu_p) = \frac{\nu_p + 2\nu_{vac}\kappa p}{1 + 2\kappa p} \quad (25)$$

Behelyettesítve a Gauss-függvény konkrét alakját:

$$\left. \frac{dN(\nu)}{d\nu_p} \right|_{\nu_p} = \frac{N_0}{\sqrt{2\pi}\sigma_p} e^{-\frac{(\nu_p - \nu_{0p})^2}{2\sigma_p^2}} \quad (26)$$

ahol:

$$\nu_{0p} = \nu_{00} + 2\kappa p (\nu_{00} - \nu_{vac}) \quad (27)$$

és:

$$\sigma_p = (1 + 2\kappa p)\sigma \quad (28)$$

Vagyis a inhomogén eloszlásfüggvény a nyomás hatására sem változtatja meg alakját, de a Gauss-függvény maximum pozíciója (ν_{0p}) és szélességi paramétere σ_p lineárisan változik a nyomás függvényében. Így azt is beláttuk, hogy az eloszlásfüggvény maximumpozíciója ugyanolyan függvény szerint követi a nyomás változását, mint az egyedi kromofór molekulák vonala (v.ö. (11) és (27)).

A most levezetett (27) és (28) egyenletek lehetőséget adnak arra, hogy a mátrix kompresszibilitását FLN mérésekből határozzuk meg.

A módszer hátránya, hogy a (27) egyenlet használatához szükség van a vákuum frekvenciára (ν_{vac}), amit továbbra is SHB mérésekkel kell az adott kromofórra meghatározni. A (28) egyenlet ugyan lehetővé tenné a kompresszibilitás meghatározását a vákuum frekvencia nélkül, de a gyakorlati alkalmazások esetén az eloszlásfüggvény szélességének meghatározása általában bizonytalanabb, mint a maximumhely meghatározása, ezért a (28) egyenlet gyakorlati alkalmazása korlátozott.

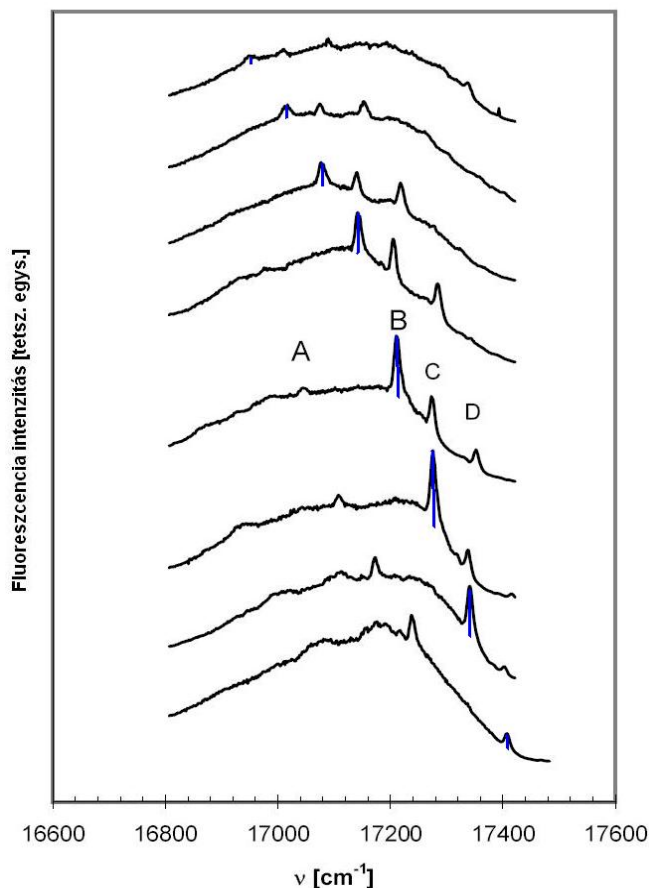
4. 4. 2. A modell próbája szerves mátrixba ágyazott kromofórral

A módszert először egy szerves mátrixba ágyazott kromofórral próbáltuk ki. Kromofór molekulánk a magnézium-mezoporfirin (MgMP) volt, ezt kívántuk ugyanis a fehérje-kompresszibilitás vizsgálatokban is használni (ld. 4.4.3. fejezet). A fehérjekörnyezet „utánzására” dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtunk, amelyet Kaposi és mtsai (1993) már sikeresen alkalmaztak erre a célra korábbi (nulla nyomáson** végzett) FLN méréseikben.

A 7,5 mmol/l koncentrációjú MgMP/DMSO oldatot a kriosztát hideg fejére szerelt gyémánt cellába töltöttük. A nyomást a rubin 693 nm-es vonalának eltolódásával mértük, ami egyben a hőmérséklet (10 ± 1 K) ellenőrzésére is szolgált (részleteket ld. 3. fejezetben). A gerjesztő festéklézer fényét 550 nm és 567 nm (18180 cm^{-1} és 17640 cm^{-1}) között 0,5 nm-es lépésekben változtatva mértük az emissziós spektrumokat. A 29. ábra mutat néhány kiválasztott spektrumot. A spektrumokon a

** Ezeket a méréseket kriogenikus hőmérsékleten végezték, tehát a minta gyakorlatilag vákuumban volt. A vákuum kifejezés helyett ebben a fejezetben a nulla nyomást használom, mert a kromofór ilyenkor oldatban van, és az oldat (minta) van vákuumban. Így különböztetem meg a Laird-Skinner elmélet „vákuum”-ától, ami azt jelenti, hogy a kromofórt nem veszik körül más molekulák (mátrix).

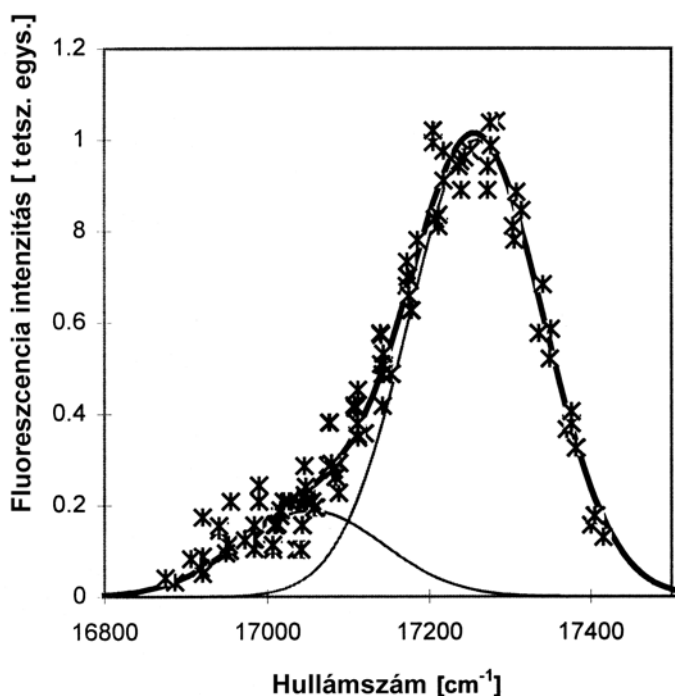
széles felbontatlan sávra szuperponálódva világosan megfigyelhetők a vékony felbontott FLN vonalak. A széles sáv a fonon csatolásnak köszönhető, ezt mint háttérrel levontuk. Az irodalmi bevezetőben (2.3.1) leírtaknak megfelelően a felbontott vonalak pozíciója a gerjesztő fény frekvenciájának (hullámszámának^{††})



29. ábra. A DMSO-ba ágyazott MgMP kromofór FLN emissziós spektrumai különböző gerjesztő hullámhosszak esetén. A gerjesztő hullámhosszak (alulról felfelé): 551 nm (18148cm^{-1}), 553, 555, 557, 559, 561, 563 nm (1770cm^{-1}) A spektrumok a jobb áttekinthetőség kedvéért függőlegesen el vannak tolva. Az A, B, C és D-vel jelölt vonalak a 896, 730, 669 és 592cm^{-1} -es gerjesztett állapotú vibrációhoz tartoznak. A kék vonal a „B” felbontott vonalhoz tartozó intenzitást jelöli a spektrumokon.

változásával párhuzamosan tolódik. A felbontott emissziós csúcs pozíciójának a gerjesztő frekvenciától (hullámszámtól) való távolsága megadja az adott vibronikus nivóhoz tartozó gerjesztett elektronállapotú vibrációs energiát. A 29. ábrán bejelölt A, B, C és D vonalakhoz az 592, 669, 730 és 896cm^{-1} -es vibrációs hullámszámok tartoznak. A „B” vonal a könnyebb azonosíthatóság kedvéért kék színnel meg van jelölve az összes spektrumon. A kék vonal hosszának hullámhossztól való függése adja szemléletesen az inhomogén eloszlásfüggvényt (IDF-et). Természetesen az IDF kiszámításához nem csak ezt a vibronikus vonalat, hanem az összes megmért vonalat felhasználtuk. A nulla nyomáson így kapott IDF-et mutatja a 30. ábra.

^{††} A frekvencia és a hullámszám arányosak egymással, a gyakorlatban inkább hullámszámot használnak.



30. ábra. A MgMP inhomogén eloszlásfüggvénye DMSO mátrixban, nulla nyomáson. Minden \times jel egy felbontott csúcsnak felel meg a 29. ábrán megmutatott spektrumokon. Az IDF-et két Gauss-görbével lehetett megilleszteni.

tartozó Gauss komponens középpontja $17260 \pm 15 \text{ cm}^{-1}$ -nél, a másiké pedig $17020 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ -nél volt. A komponensek szélességében nem volt szignifikáns különbség, mindkét görbe félérték-fél szélessége^{††} $100 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$ -nek adódott. A két IDF komponensnek megfeleltethető kromofór-populációban az átlagos oldószereltolódás ($\nu_{00} - \nu_{\text{vac}}$, ld. (22) egyenletet) különböző, ami a kromofórnak a környezettel való eltérő kölcsönhatását, azaz a kromofór eltérő beágyazottságát jelenti.

Az IDF eltérően változott a nyomás hatására, attól függően, hogy a nyomást szobahőmérsékleten alkalmaztuk, és a mintát azután hűtöttük le, vagy a már lehűtött mintát nyomtuk össze.

Ha a mintát szobahőmérsékleten nyomtuk össze, és utána hűtöttük le, akkor az IDF két komponense a nyomás növekedésével átpopulálódott. A 31. ábra mutatja a

A MgMP/DMSO rendszerben két Gauss-függvénnyel lehetett az IDF-et illeszteni. Hasonló bimodális eloszlásfüggvényt kaptak Kaposi és mtsai (1993) is egy hasonló kromofór (Mg-protoporfirin) esetén számos szerves oldószerben, köztük DMSO mátrixban is. A két populáció aránya az IDF

Gauss-komponenseinek területaránya alapján 5:1 (83% és 17%). Feltettük, hogy a két konformációhoz tartozó abszorpciós állapotok megegyeznek. A jobban populált konformációhoz

^{††} Félérték-fél szélesség alatt a görbe maximumának felénél mért szélesség fele értendő. Kapcsolata a Gauss görbe 4.4.1. fejezetben bevezetett σ paraméterével : félérték-fél szélesség $= \sigma \sqrt{2 \ln 2} \approx 1,177 \sigma$

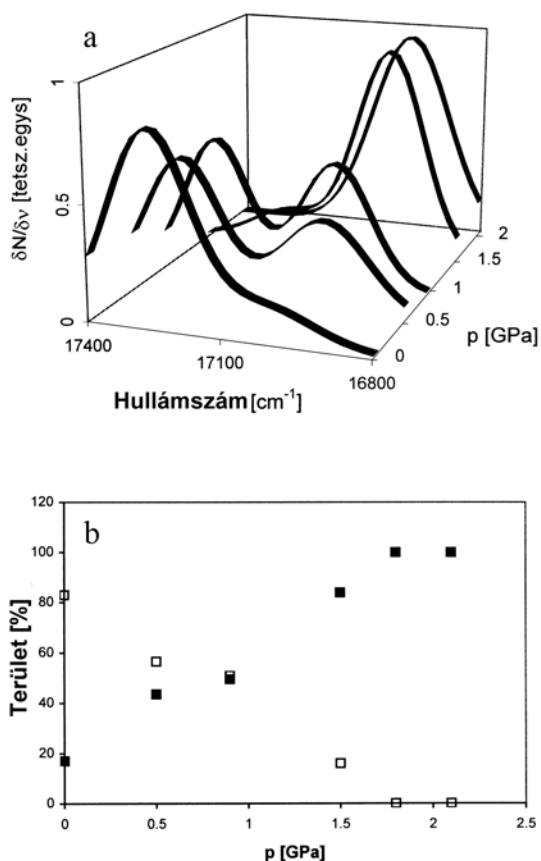
területarányokat a nyomás függvényében. A területarányokból a Boltzmann-eloszlás felhasználásával becslést lehet adni a két komponens térfogatkülönbségére (ΔV). Feltéve, hogy az IDF komponenseinek területe arányos a megfelelő állapotok betöltöttségeivel, felírhatjuk, hogy

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{N_1}{N_2} \propto e^{-\frac{p\Delta V}{RT}} \quad (29)$$

ahol A_1 ill. A_2 a két Gauss-komponens görbe alatti területe, N_1 , N_2 pedig az ezeknek a konformációknak megfelelő betöltöttség, $\Delta V = V_1 - V_2$. Az $\ln(A_1/A_2)$ -t a nyomás függvényében egyenessel illesztve a meredekségre $\Delta V/RT = 2,3 \pm 0,3 \text{ GPa}^{-1}$ -t

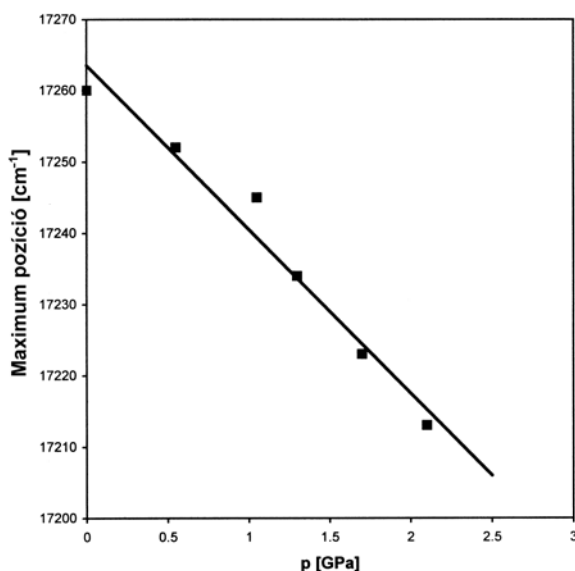
kapunk. Innen megkaphatjuk a térfogatkülönbséget, ha tudjuk a hőmérsékletet. Fontos azonban észrevenni, hogy hőmérsékletnek nem helyettesíthetjük be egyszerűen a 10 K-es mérési hőmérsékletet, mert a két konformáció nem volt egyensúlyban ezen a hőmérsékleten. Ez abból is látszik, hogy amikor a nyomást a 10 K-re lehűtött mintán alkalmaztuk, akkor nem kaptunk átpopulálódást a két konformáció között. Meg kellett tehát határoznunk azt a legkisebb hőmérsékletet, ahol a minta még termikus egyensúlyban volt, mielőtt ez a helyzet a hőmérséklet csökkentésével befagyott volna.

Ennek eldöntésére a következő kísérletsorozatot végeztük. A mintát különböző hőmérsékleteken nyomtuk össze 1 GPa feletti nyomásra (ahol az átpopulálódásnak már világosan



31. ábra. A nyomás hatása a MgMP/DMSO rendszer IDF-jére, amikor a nyomást szobahőmérsékleten alkalmaztuk. a: Az IDF-ek különböző nyomáson. b: A két komponens területének aránya a nyomás függvényében.

látszania kellett), majd tovább hűtöttük 10 K-re, ahol megmértük az IDF-et. Azt tapasztaltuk, hogy 200 K-en ill. e feletti hőmérsékleten való összenyomás alkalmával bekövetkezik az átpopulálódás, 150 K ill. alacsonyabb hőmérsékletek esetén pedig nem. Így azt a hőmérsékletet, aminek az egyensúlyi eloszlása befagyott,



32. ábra. A MgMP/DMSO rendszer IDF-jének maximum pozíciója a nyomás függvényében, amikor a nyomást a kriogenikus hőmérsékleten alkalmaztuk. A vonal a pontokra illesztett egyenes.

175±25 K-nek vettük. (Ez a pontosság elég volt, hiszen a meredekség sem volt pontosabb.) Ennek felhasználásával $\Delta V = 3,3 \pm 0,7 \text{ cm}^3/\text{mol}$ adódik, ami $5,5 \pm 1,2 \text{ Å}^3$ -nek felel meg molekulánként. Ez hat hidrogénatom térfogatának, vagy a vízmolekula térfogatának 1/5-ének felel meg.

A nagyobb elektronátmeneti energiával rendelkező populáció térfogata nagyobb. Ez dominál a nulla nyomású esetben. A nagy nyomáson kapott populáció csökkent átmeneti energiája a mátrix és a kromofór közti erősebb

kölcsönhatásra utal, amely megfelel egy szorosabban összeillesztett molekulaelrendezésnek. Ez a szoros elrendezés adhat magyarázatot a kisebb átmeneti energiájú kromofórok kisebb térfogatára. (A térfogathoz, ill. ennek megváltozásához itt természetesen hozzá kell számolni a környezettel való kölcsönhatás következtében a környezetben beálló térfogatváltozásokat is.) Az a tény, hogy az eltérő térfogatú kromofórok különböző kölcsönhatásban vannak a környezetükkel, azt a feltételezést erősíti, hogy ezek különböző konformációt ill. a mátrixba való különböző beágyazottságot takarnak. A kisebb térfogathoz tartozó konformer azonban energetikailag és/vagy entrópiailag nem preferált nulla nyomáson.

Ha a nyomást 10 K-en alkalmazzuk, akkor a két állapot nem tud egymásba átalakulni. Azonban jól megfigyelhető az IDF eltolódása. A 32. ábra mutatja az IDF domináns komponensének pozícióját a nyomás függvényében. A Laird-Skinner elméletnek az előző fejezetben ismertetett, általam az FLN-re továbbfejlesztett verzióját alkalmazva a 32. ábra illesztett egyenesének meredekségéből meghatározhatjuk a mátrix, jelen esetben a DMSO kompresszibilitását. A meredekség a (27) egyenlet alapján:

$$\frac{\partial \nu_{0p}}{\partial p} = 2\kappa(\nu_{00} - \nu_{vac}) \quad (30)$$

amiből a kompresszibilitás:

$$\kappa = \frac{1}{2(\nu_{00} - \nu_{vac})} \frac{\partial \nu_{0p}}{\partial p} \quad (31)$$

A kompresszibilitás meghatározásához természetesen szükségünk van még az ún. vákuum frekvenciára (ν_{vac}) is. Szerencsére ez a mi kromofórnk esetén irodalmi mérésekből (Balog és mtsai, 1977) rendelkezésre állt: $\nu_{vac} = 17560 \text{ cm}^{-1}$. A 32. ábra egyenesének meredeksége $-23 \pm 2 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$. Ezen adatok felhasználásával a kompresszibilitás: $\kappa = 0,042 \pm 0,004 \text{ GPa}^{-1}$.

Sajnos a DMSO-nak csak folyadékfázisú kompresszibilitását lehetett az irodalomban megtalálni. Czeslik és Jonas (1999) NMR spektroszkópiai mérésekkel meghatározták a DMSO Tait-egyenletének paramétereit a 30-70°C közötti hőmérséklet-tartományban. Ebből az egyenletből kb. egy nagyságrenddel nagyobb kompresszibilitás adódik, de hangsúlyozottan a folyadék fázisra, míg a mi méréseink a szilárd fázisra vonatkoznak (a DMSO fagyáspontja 17°C).

Ez a nagyságrendi eltérés azonban figyelembe véve az olvadékok és szilárd fázisok közti tipikus kompresszibilitás-különbségeket, elfogadhatónak tűnik.

Az a tény, hogy a 10 K-en összenyomott rendszerben nem jött létre átpopulálódás, azt mutatja, hogy a két konformer jelentősen különbözik egymástól, és a köztük való átmenet a környezet jelentős átrendezésével is együtt kell hogy járjon. Ez az átrendeződés nem jöhet létre alacsony hőmérsékleten, mert az ehhez szükséges aktivációs energia túl nagy. Úgy is fogalmazhatjuk, hogy az átrendeződés sokkal

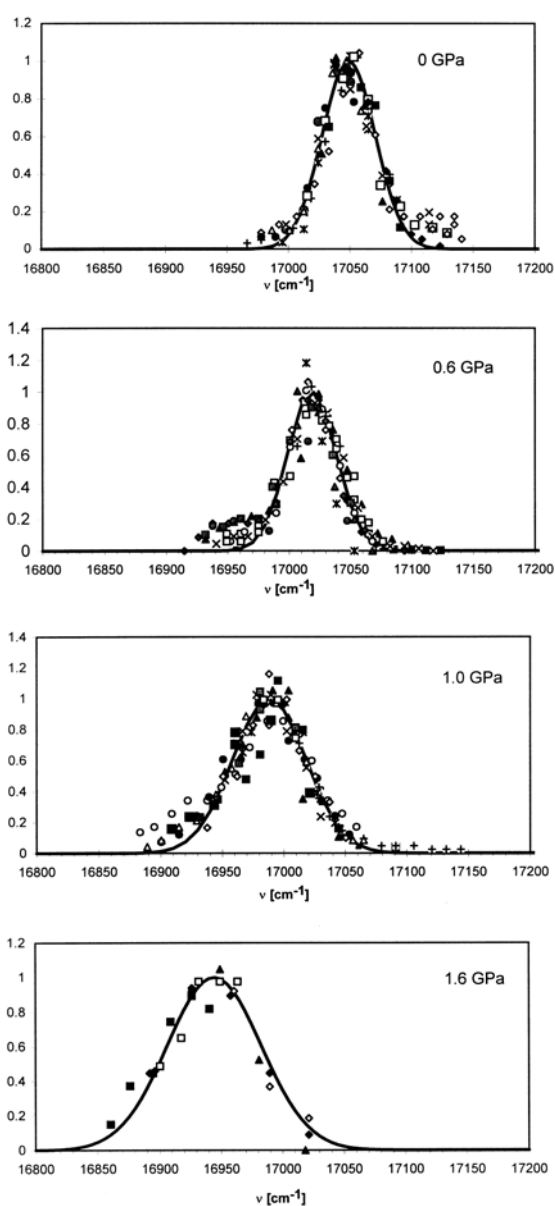
hosszabb időskálán történik, mint a mérés ideje, a kromofór tehát megmarad a nagy nyomáson metastabillá vált konformációban.

Összegezve tehát megmutattuk, hogy a DMSO (dimetil-szulfoxid) mátrixba ágyazott magnézium-mezoporfirin két különböző konformációt tud felvenni. Meghatároztuk a két konformáció közti térfogatkülönbséget, ami $3,3 \pm 0,7 \text{ cm}^3/\text{mol}$ -nak adódott. A mátrix kompresszibilitását is meghatároztuk, ami $0,042 \pm 0,004 \text{ GPa}^{-1}$ volt.

4. 4. 3. A tormaperoxidáz enzim kompresszibilitása

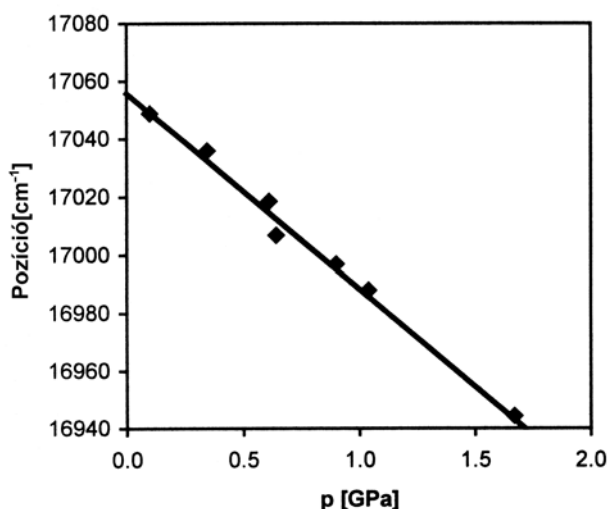
A fehérjék közül a tormaperoxidázra esett a választásunk, mivel ez egy nyomás-denaturációval szemben stabilnak mutakozó hem-fehérje. A magnézium-mezoporfirinnel helyettesített torna-peroxidázt mértük. A helyettesítésre a vas-porfirin fluoreszcencia élettarta-mának rövidsége miatt volt szükség, ami nagy homogén kiszélesedéshez vezet, ezért a vas-porfirin alkalmatlan FLN mérésekre. A helyettesített hem-fehérjéknek az a további előnyük, hogy a fluoreszcens porfirin a fehérje aktív helyéről, annak környezetéről nyújt információt.

A magnézium-mezoporfirinnel helyettesített tormaperoxidázt (MgMP-HRP) $1,6 \text{ mmol/l}$ koncentrációban oldottuk fel pH7-es foszfát pufferben, és utána az előző fejezetben leírtaknak megfelelően a gyémánt cellában 10 K-en mértük az FLN spektrumokat a nyomás



33. ábra A MgMP-HRP IDF-jei néhány kiválasztott nyomáson.

függvényében. A minta átlátszóságának biztosítása végett 50% glicerint is tartalmazott, ami nem befolyásolja a fehérje szerkezetét (Fidy és mtsai, 1992). Bár a tormaperoxidáz kivételesen nagy nyomásstabilitással rendelkező fehérje, minden esetben a már kriogenikus hőmérsékletre hűtött mintát nyomtuk össze, hogy elkerüljük a nyomás által szobahőmérsékleten okozott konformációs változásokat. A 33. ábra mutatja az IDF-eket néhány nyomásértéken. A görbe egy domináns komponenst mutat, bár az eloszlásgörbe két szélén nagyon kis amplitúdójú



34. ábra. A MgMP-HRP IDF-jének maximum pozíciója a nyomás függvényében

fél szélessége 25 cm^{-1} . A kromofór tehát sokkal jobban meghatározott környezetben helyezkedik el a fehérje-zsebben, mint a szerves oldószerben. A nulla nyomáson mért IDF pozíciója és szélessége megfelel a korábbi irodalmi méréseknek.

A 4.4.1. fejezetben kimunkált elméleti leírásnak megfelelően (27 és 28 egyenletek) az IDF-ek eltolódnak, és egyben ki is szélesednek a nagy nyomás hatására. A nyomás függvényében ábrázolt maximum pozíciók pontjai (34. ábra) jól illeszkednek egy egyenesre, aminek a meredeksége $67 \pm 3 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$. Ezt és a már korábban említett irodalmi vákuum frekvenciát felhasználva a tormaperoxidáz kompresszibilitására $\kappa = 0.066 \pm 0.003 \text{ GPa}^{-1}$ adódik.

komponensek jelenléte kétségtelen. Ezeket Balog és mtsai (2000) az MgMP nemspecifikus kötődésével magyarázták. Ezek tehát a jelen munka szempontjából nem lényegesek és ezért a továbbiakban csak a fő komponensre fordítjuk figyelmünket. A nulla nyomáson mért IDF jelentősen keskenyebb mint a szerves mátrixba ágyazott kromofór esetében, félérték-

Az irodalomban eddig két olyan mérést közöltek, amely a tormaperoxidáz kompresszibilitására vonatkozott. Ezek az adatok a mostani eredményünkkel együtt az V. táblázatban vannak összefoglalva. A három mérés eltérő technikával, ill. körülmények között történt. A jelen mérések eredményeként kapott érték kisebb, mint az ugyancsak kriogenikus hőmérsékleten, de nagyságrendekkel kisebb

V. Táblázat.

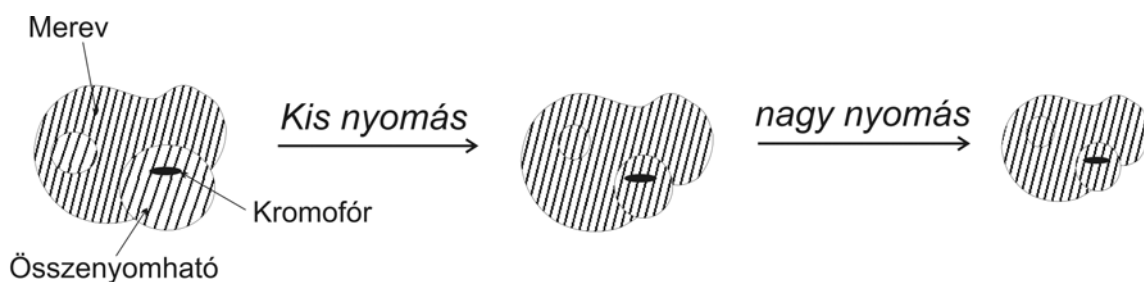
A tormaperoxidáz különböző módszerekkel meghatározott izotermikus kompresszibilitása

Módszer	κ [GPa]	kísérleti körülmények		forrás
		T [K]	p [GPa]	
FLN	0,066	10	0.1-1,7	jelen munka (P11 saját cikk)
SHB	0,106	1,5	0-0,0011	Balog és mtsai (1997)
Ultrahang	0,067	298	NA*	Gekko és Hasegawa (1986)

* Az ultrahangos mérésekben alkalmazott hangnyomásról nincs közvetlen adat, de a hasonló mérések alapján valószínűsíteni lehet, hogy ez nem nagyobb mint 0,1 MPa.

nyomástartományban SHB-vel mért érték, de megegyezik a szobahőmérsékleten ultrahangsebesség-mérésekből számított értékkel. Az ultrahangos mérések az adiabatikus kompresszibilitást adják, amiből a $\kappa_T = \kappa_S + \alpha^2 T / \rho C_p$ formulával kell kiszámolni az izotermikus kompresszibilitást (α a hőtágulási együttható, ρ a sűrűség, C_p az állandó nyomáson mért fajhő). Az ultrahangos mérések az alkalmazott nyomás (hangnyomás) szempontjából az alacsony nyomás tartományába esnek.

Az FLN és az SHB kompresszibilitási adatok eltérését úgy értelmezhetjük, hogy a kompresszibilitás a kis (néhány MPa) és a nagy (100MPa-GPa) nyomás tartományokban eltérő. Ennek megértéséhez figyelembe kell venni a fehérje szerkezetét. A fehérje összenyomása valójában nem teljesen izotróp módon történik. A fehérje összenyomásakor a másodlagos és harmadlagos szerkezet deformációjával a fehérjében levő üregek térfogata csökkenhet. A nagy nyomáson mért kisebb kompresszibilitást úgy értelmezzük, hogy ezek az üregek „elfogytak”, és a további kompresszió ezáltal nagyobb energiát ill. nyomást igényel. Modellünk szerint a fehérjében kompresszibilisebb és kevésbé kompresszibilis tartományok (domének) vannak. Kis nyomás hatására főleg a flexibilisebb, azaz könnyebben összenyomható domének térfogata változik, amely nagyobb kompresszibilitást eredményez. Nagy



35. ábra Az eltérő kompresszibilitású domének összenyomódása alacsony és nagy nyomás hatására. Kis nyomáson csak az összenyomható domén térfogata csökken, majd miután ez teljesen összenyomódott, a további összenyomódás homogén.

nyomáson ezek a domének már teljesen összenyomott állapotban vannak, így az egyöntetűen kompakttá vált szerkezet további összenyomása nehezebb, ezért kapunk nagy nyomáson kisebb kompresszibilitást. Ezt mutatja a 35. ábra sematikusan. Az FLN és az ultrahangos mérések egybeesését a véletlennek tudjuk be, úgy gondoljuk, hogy a hőmérséklet és a nyomástartomány különbözőségének hatása kiegyenlítette egymást.

Összefoglalva, a tormaperoxidáz kompresszibilitását 10 K-en a 0,1-1,7 GPa tartományban $0,066 \text{ GPa}^{-1}$ -nak találtuk. Eredményeinket összevetettük a sokkal kisebb nyomástartományban végzett SHB és ultrahangos mérésekből kapott kompresszibilitás értékekkel. Az eltérést eltérő kompresszibilitású fehérjedomének jelenlétével magyaráztuk. Eszerint a fehérje flexibilisebb doménjei alacsony nyomáson nagyobb deformációt mutatnak, és ez vezet a nagyobb kompresszibilitás értékhez. Modellünk szerint a nyomás növelésével először a nagyobb kompresszibilitású (flexibilisebb) domének nyomódnak össze, mialatt a rigidebb domének szerkezete csak kissé deformálódik. Nagy nyomáson a flexibilis régiók már teljesen össze vannak nyomva, és merevvé válnak, azaz az egész fehérje merev, kis kompresszibilitású lesz. Modellünk alapján azt állapítottuk meg, hogy a tormaperoxidázban eltérő flexibilitású fehérjedomének vannak.

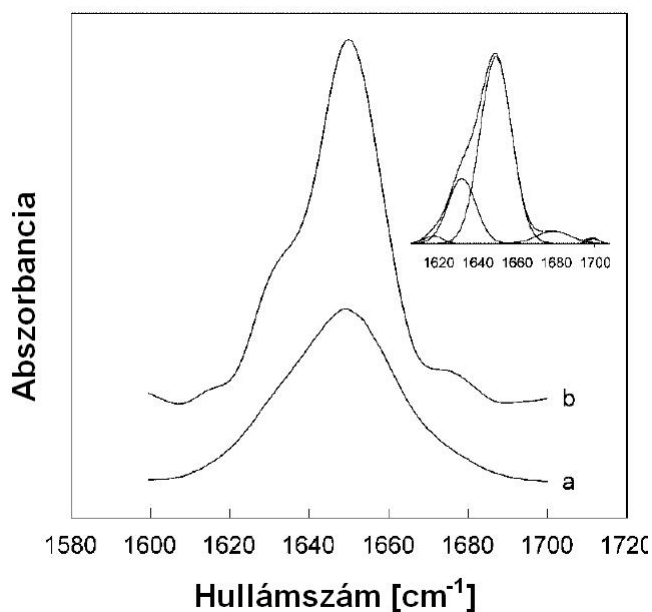
4. 5. A hő-, nyomás-, és hidegdenaturált fehérjeállapotok összehasonlítása FTIR spektroszkópiával és termodinamikai analízissel. (T5, P12)

A hideg- és hődenaturált fehérjeszerkezetek összehasonlítása tekintetében az irodalom ellentmondásos volt. A nyomás-denaturált és a másik két módon kigombolyodott fehérje-konformáció összehasonlítása hiányzott az irodalomból.

FTIR spektroszkópiai mérésekkel hasonlítottuk össze a lószív mioglobint hő-, nyomás-, és hidegdenaturált állapotait. A mioglobint pD8,2 Tris-DCI pufferben oldottuk 75mg/ml koncentrációban. A nyomás- és hideg-denaturációt a gyémánt cellában mértük, a hődenaturációt pedig CaF₂ ablakkal ellátott küvettában.

4.5.1. A natív szerkezet

A 36. ábra a lószív mioglobin infravörös spektrumának amid I sávját mutatja (mért és dekonvolvált spektrum). A betétábrában a dekonvolvált spektrum Gauss-függvényekkel történő illesztését látjuk. Az amid I sávon kívül még az amid II ill. II' sávokat, valamint a tirozin és glutamát oldalláncok rezgési vonalát figyeltük meg 1517 ill. 1566 cm⁻¹-nél (Rahmelov és mtsai, 1988, Ismail és mtsai 1992). A lószív mioglobinban két tirozin (a 103-as és 146-os pozícióban), valamint 13, a szerkezetben egyenletesen eloszlott glutamát aminosav található (Evans és Brayer, 1990).



36. ábra A lószív mioglobin infravörös spektrumának amid I sávja. a: eredeti spektrum, b: dekonvolvált spektrum. betét: Gauss-görbékkel illesztett dekonvolvált spektrum.

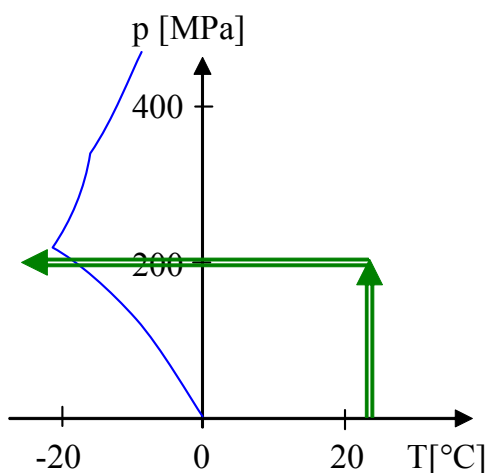
VI. Táblázat. A mioglobín másodlagos szerkezeti arányai (%-ban) natív, hődenaturált (90°C), hideg denaturált (-21°C, 200 MPa), nyomásdenaturált (1GPa) állapotban, ill. ezen kezelések után.

állapot	α -hélix+ random	kinyújtott lánc	hurok	intermolekuláris β -lemez
natív	73,5	15	11,5	0
hődenaturált	47,5	14	11,5	27
hődenaturáció után	47	13	15,5	24,5
hidegdenaturált	42	52	6	0
hidegdenat. után	37,5	49,5	6	0
nyomás-denaturált	32	61	7	0
nyomás-denat. után	45,5	45,5	9	0

A fehérje natív szerkezetét a 36. ábra betétjében látható illesztés és a II. táblázat (2.2.5. fejezet) hozzárendelése alapján állapítottuk meg. Ezek az adatok a VI. táblázatban vannak összefoglalva. A natív állapotú fehérje spektrumának illesztése egybeesik Evans és Brayer (1990) eredményeivel, akik 74%-os alfa hélix arányt találtak a fehérje röntgen-kristallográfiával mért szerkezetében. Sajnos a spektrumban a helikális és rendezetlen szerkezeteket nem lehetett külön megilleszteni, ezért ezek együttes százalékos arányát adjuk meg a táblázatban. Természetesen a spektrumról megállapítható, hogy abban a rendezetlen, vagy a helikális szerkezet dominál, mivel ez utóbbira keskenyebb, az előbbire pedig széles amid I sáv jellemző.

4.5.2. A hideg-denaturáció

A hideg-denaturáció detektálását általában nehezíti, vagy teljesen lehetetlenné teszi, ha az a víz fagyáspontja alatti hőmérsékleten történik. Egyes kutatók ilyenkor kémiai eszközökkel kicsit destabilizálják a fehérjét, kissé „rásegítve” a vizsgálni kívánt effektusra, hogy az magasabb hőmérséklettartományba essen. Rendszerint guanidin hidrokloridot (GuHCl) vagy ureát alkalmaznak szubdenaturáló koncentrációban. Azonban a GuHCl vagy urea oldatban levő fehérje már jelentősen különbözhet a natívtól, így a vizsgálandó effektust ezek a „rásegítő” kémiai ágensek megváltoztathatják. Ezt mindenképpen el szeretnénk volna kerülni. Bár a viszonylag tömény fehérjeoldat által okozott olvadáspont-csökkenés itt segítségünkre van, mi ennél hatásosabb módszert alkalmaztunk. A víz fázisdiagramját használtuk ki,

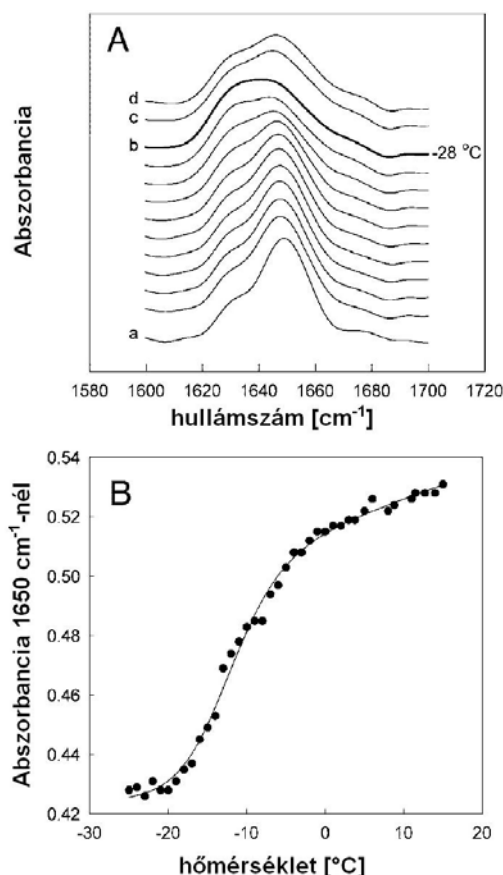


37. ábra. A hideg denaturációs útvonal a p - T síkon. A kék görbe jelzi a desztillált víz fagyásgörbéjét, amit Bridgmann (1935) mérései alapján rajzoltunk meg.

amelynek az a specialitása, hogy mintegy 200 MPa-ig az olvadási hőmérséklet csökken a nyomás növekedésével, ugyanis az I-es típusú jég fajlagos térfogata nagyobb, mint a vízé. Ezért a hideg-denaturációs mérésünket 200 MPa nyomáson végeztük. Ez a nyomás, mint azt a nyomás-denaturációnál látni fogjuk, még nem hoz létre konformációs változásokat a mioglobinszerkezetében, de a rendelkezésünkre álló hőmérséklet-

tartományt jóval kiszélesíti a negatív hőmérsékletek irányába. A 37. ábra mutatja a mérési útvonalat a p - T síkon, valamint a (desztillált) víz fázisdiagramjának részleteit. Bár a mérési útvonal látszólag áthalad a fagyásgörbén, hangsúlyozni kell, hogy a mérés során a mintában levő nehézvíz nem fagyott meg, amit a víz 3500 cm^{-1} körüli vibrációs sávja bizonyított. Ennek az oka a már említett fagyáspontcsökkenés lehetett.

A 38. A ábrán mutatom be a hűtési ciklus során mért spektrumokat. A hőmérséklet csökkenésével a minta abszorbanciája 1650 cm^{-1} -nél csökken, a $1620\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$



38. ábra. A) A lószív mioglobinsamid I sávja a hideg-denaturáció során. Az a és d görbe kivételével mindegyik spektrum 200 MPa-on van felvéve. A hőmérsékletek (alulról felfelé, °C-ban): 20 (a), 20, 15, 11, 5, 0, -5, -10, -15, -20, -25, -28 (b), 10 (c), 20 (d). B) A 1650 cm^{-1} -nél mért abszorbancia a hőmérséklet függvényében.

tartományban pedig növekszik. Ezt főleg a rendezetlen szerkezetet jelző 1640 cm^{-1} -es széles spektrumkomponens megjelenése okozza. Az abszorbancia növekedése 1624 cm^{-1} -nél ugyanolyan változást mutat, mint az 1566 cm^{-1} -es csúcs intenzitásváltozása. Ez utóbbi a glutamát oldalláncok aszimmetrikus COO^- vibrációihoz rendelhető.

Az amid I sáv alapján határoztuk meg a hideg-denaturáció átalakulási hőmérsékletét, amit a 1650 cm^{-1} -es csúcs abszorbancia-változásának illesztése során illesztett görbe középpontjához tartozó hőmérséklettel definiáltunk. Az abszorbancia illesztését a következő modell segítségével végeztük el.

Feltételeztük, hogy az abszorbancia a natív ill. a denaturált fehérje esetén is a hőmérséklet lineáris függvénye: $A_{\text{natív}} = A_n + T B_n$, $A_{\text{denaturált}} = A_d + T B_d$. A van't Hoff egyenlet $-\infty$ -tól T -ig történő kiintegrálásával kapjuk, hogy a denaturáció egyensúlyi állandója:

$$K = e^{-\frac{\Delta H}{RT} + \text{konst}} = e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{1/2}} \right)} \quad (32)$$

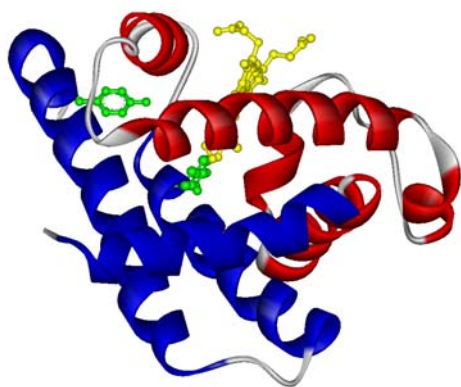
ahol ΔH a denaturációhoz tartozó entalpiaváltozás, $T_{1/2}$ pedig az átmenet középpontjához ($K=1$) tartozó hőmérséklet. Ha egy T hőmérsékleten a fehérjemolekulák X_d aránya van denaturált állapotban, akkor a megfigyelt abszorbancia:

$$A = (1-X_d) A_{\text{natív}} + X_d A_{\text{denaturált}} = (1-X_d) (A_n + T B_n) + X_d (A_d + T B_d) \quad (33)$$

Az egyensúlyi állandó $K = \frac{X_d}{1-X_d}$ definíciójának felhasználásával a mért abszorbanciát a következő függvénnyel tudjuk illeszteni:

$$A = \frac{(A_n + T B_n) + (A_d + T B_d) e^{\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2}} - \frac{1}{T} \right)}}{1 + e^{\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2}} - \frac{1}{T} \right)}} \quad (34)$$

Ezzel a függvénnyel illesztettük a 38. B ábrán látható görbét. (Mivel a hidegdenaturált állapotban nem állt rendelkezésre elég adat, a $B_n = B_d$ egyszerűsítő feltételezéssel éltünk. A fenti egyensúlyi termodinamikai leírás két alapfeltevése, hogy a folyamat egyensúlyi és reverzibilis. Mivel az átalakulás nem volt teljesen

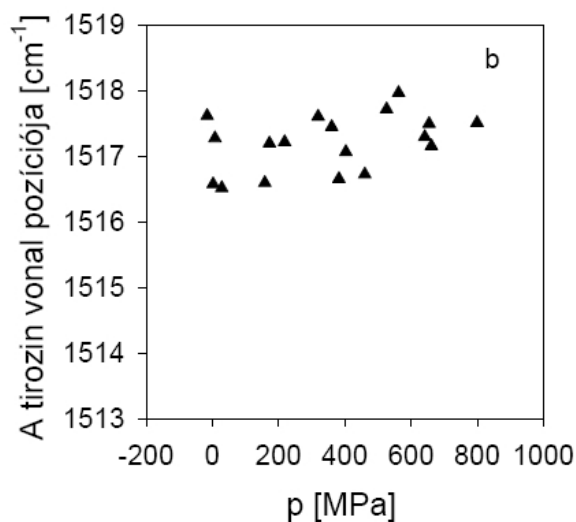
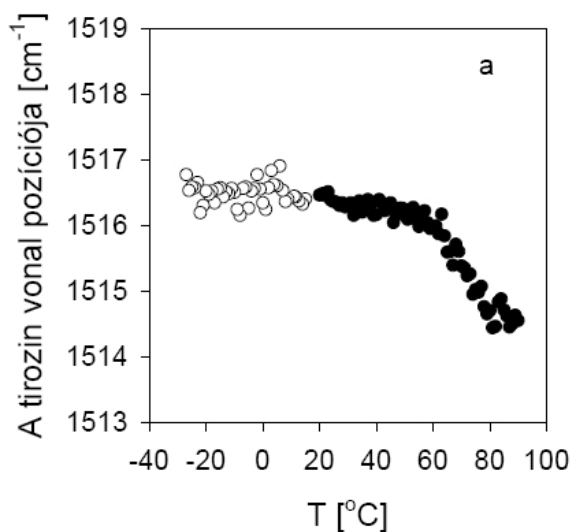


39. ábra. A lószív miogloblin szerkezete. Az A, G és H hélixek kékkel vannak jelölve. Zöld szín mutatja a tirozinokat.

reverzibilis, a kapott entalpia-változást fenntartással kezeltük, és az illesztett adatok közül csak a $T_{1/2}$ értéket használtuk az átmeneti hőmérséklet becslésére.

A hideg-denaturáció hőmérsékletére a fenti modell illesztésével - $12,7 \pm 0,4$ °C adódott.

Az amid II sáv nem tűnik el teljesen még -25°C-on sem, ami jóval a hideg-denaturációs hőmérséklet alatt van. Ez azt mutatja, hogy a fehérje szerkezet egy része a rendezetlenségben is kompakt marad, mert a hidrogén-deutérium (H/D) kicserélődés a hidegdenaturált állapotban sem megy végbe. Ez egybeesik Nash és Jonas (1997) megállapításával, akik NMR vizsgálataik alapján feltételezték, hogy a hidegdenaturált állapot egy korai folding intermedier állapotra hasonlít. Ugyanez a csoport a ribonukleáz A vizsgálata során azt találta, hogy a hidegdenaturált állapotban a fehérje magja a natívhoz hasonló állapotban marad (Zang és mtsai 1995). Molekuláris dinamikai számolások azt mutatják, hogy az A, G



40. ábra. A lószív miogloblin tirozin rezgési frekvenciájának a) hőmérséklet-, b) nyomásfüggése. (○ hideg-, ● hő-, ▲ nyomás-denaturációs mérés)

és H hélixek alkotják azt a belső magot, ami a fehérje feltekeredése során legelőször kialakul (Floriano és mtsai, 1998). Ezek a hélixek az apomioglobin feltekeredésének korai szakaszára jellemző intermedierben is megtalálhatóak (Jennings és Wright, 1993). A fehérjében két tirozin van, amelyek a 103-as és a 146-os pozícióban, a G és a H hélixeken helyezkednek el (39. ábra). A 40. ábra mutatja a tirozin 1516 cm^{-1} -es rezgési frekvenciájának változását a hőmérséklet függvényében. A rezgési frekvenciának a hideg-denaturáció során tapasztalt változatlanlansága alátámasztja azt a feltételezést, hogy a G és a H hélixek részt vesznek az említett belső mag kialakításában, ami a folding intermedier és egyben a hideg denaturált állapotnak is része.

Amint a 38. ábráról látható, a hideg-denaturáció nem teljesen reverzibilis, a szobahőmérsékletre és atmoszferikus nyomásra való visszatérés után a spektrum szélesebb, a kinyújtott láncok mennyisége megnő a helikális szerkezet rovására, ami azt mutatja, hogy a fehérje (vagy legalább a fehérjemolekulák egy része) nem nyeri vissza a natív konformációját.

4.5.3. A nyomás-denaturáció

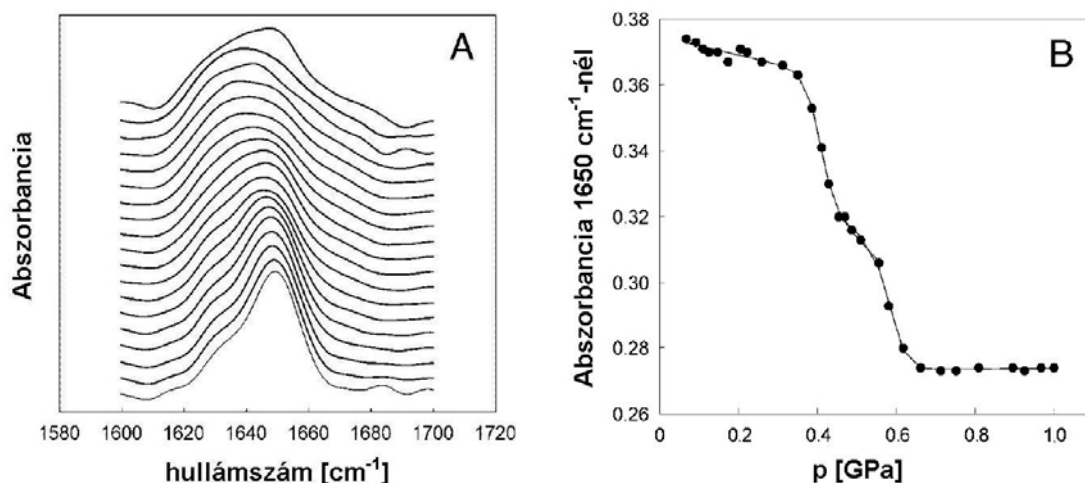
A nagy nyomásnak a mioglobin FTIR spektrumára gyakorolt hatását láthatjuk a 41. ábrán. Az illesztést a (32) egyenlettel analóg

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT} + konst} = e^{-\frac{\Delta V}{RT}(p - p_{1/2})} \quad (35)$$

összefüggés felhasználásával végeztük el. Jóval az átalakulási nyomás felett illetve alatt az abszorbanciát a nyomás lineáris függvényének tekintettük, hasonló módon, ahogy azt a hőmérséklettől függő méréseknél tettük. Az abszorbancia hasonló meggondolások után az

$$A = \frac{(A_n + pB_n) + (A_d + pB_d)e^{\frac{\Delta V}{RT}(p_{1/2} - p)}}{1 + e^{\frac{\Delta V}{RT}(p_{1/2} - p)}} \quad (36)$$

összefüggéssel írható fel. Ezt használtuk a 1650 cm^{-1} –nél mért abszorbancia illesztésére, azzal a kiegészítéssel, hogy a két átmenetet külön-külön illesztettük meg. Az átalakulási nyomásokra $403 \pm 4\text{ MPa}$, valamint $590 \pm 5\text{ MPa}$ adódott. A kétlépcsős



41. ábra. A: A lószív mioglobín amid I sávja a következő nyomásokon (alulról): 0,07; 0,13; 0,18; 0,24; 0,30; 0,38; 0,42; 0,45; 0,48; 0,51; 0,54; 0,64. 0,70; 0,84; 0,9; 0,95; 1,0; 1,15; 0,001 GPa. B: Az 1650 cm⁻¹-nél mért abszorbancia a nyomás függvényében az illesztett kétlépcsős függvényvel.

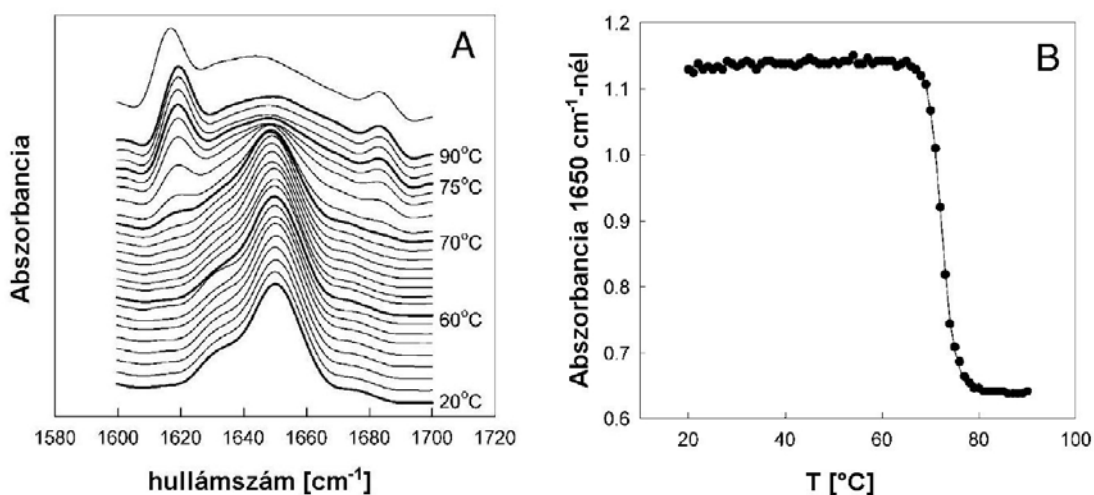
átalakulás úgy értelmezhető, hogy a denaturáció során először egy részlegesen rendezett szerkezet alakul ki, amelyet az olvadt gombolyag (molten globule) névvel szoktak illetni az irodalomban. A nyomás-denaturáció nem teljesen reverzibilis, ahogy az a 41. ábra felső spektrumából és a VI. táblázat adataiból is látható.

A mioglobinton végzett molekuláris dinamikai számolások a 700 MPa nyomáson olyan olvadt gombolyag állapotot találtak, amelyben a helikális szerkezet 30-40% körüli (Floriano és mtsai, 1998). Természetesen a molekuláris dinamikai számolásokat fenntartással kell kezelni, mivel a nyomás-denaturáció kinetikája feltételezhetően sokkal lassabb, mint a számolásokkal követhető időtartam. (Ruan és mtsai (2003) néhányszor száz másodperc hosszúságú karakterisztikus denaturációs időket mértek). A 700 MPa nyomáson végzett számolásokban tehát a fehérje valószínűleg nem volt termikus egyensúlyban. Ennek ellenére a számolások mégis alátámasztják azt az általános képet, miszerint a fehérje különböző tartományai eltérő stabilitással rendelkeznek, ezért nem egyszerre gombolyodnak szét, vagyis a nyomás-denaturáció során olvadt gombolyag konformáció keletkezik, mint arra kísérleteink is utalnak.

A tirozin rezgés eltolódása a nagyobb hullámszámok felé (40. b ábra) a tisztán fizikai kompresszió eredménye. Ez is azt támasztja alá, hogy a nyomásdenaturált állapotban megmaradt a szerkezet egy része.

4.5.4. A hődenaturáció

A 42. ábrán látható az infravörös spektrum változása a hőmérséklet függvényében atmoszferikus nyomáson. 72 °C közelében a 1650 cm⁻¹-es, a helikális szerkezetre



42. ábra. A) A lószív mioglobin amid I sávja a következő hőmérsékleteken: **20**, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, **60**, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, **70**, 71, 72, 73, 74, **75**, 80, 85, **90**°C, valamint 25 °C-on a lehűtés után. B) Az 1650 cm⁻¹-nél mért abszorbancia a hőmérséklet függvényében, az illesztett görbével.

jellemző komponens abszorbanciája gyorsan csökken. Ezt a görbét is a (34) egyenlettel illesztettük, aminek eredményeként a $72,3 \pm 0,1$ °C átmeneti hőmérsékleti értéket kaptuk. Szembetűnő az intermolekuláris antiparallel béta lemezre jellemző oldalsávok (1618 cm⁻¹ és 1683 cm⁻¹) megjelenése a hődenaturációs átalakulással párhuzamosan. Egyúttal az amid II sáv (1550 cm⁻¹) intenzitása folyamatosan csökken a hőmérséklet emelkedésével, és 70 °C-nál gyakorlatilag eltűnik, azaz a H/D kicserélődés teljessé válik. Natív állapotban a hőmérséklet növekedésével emelkedő H/D kicserélődés a fehérje növekvő dinamikájával magyarázható. A fehérje dinamikus hőmozgása közben rövid időre bizonyos szerkezeti részek átmenetileg kissé kitekeredhetnek, ami előmozdítja az itt található hidrogének kicserélődését (Englander és mtsai, 1996, Englander, 2000).

A tirozin rezgés frekvenciája a hődenaturációval párhuzamosan eltolódik az alacsonyabb frekvenciák felé (40. A ábra). Az átmenet kooperatív, középpontja ($72,2 \pm 2,9$ °C) megegyezik az 1650 cm⁻¹-es abszorbancia csökkenésének átmeneti

hőmérsékletével, de az átmenet jóval szélesebb. A rezgési frekvencia csökkenése ellentétes azzal, amit Fabian és mtsai (1993) ill. Panick és Winter (2000) találtak a ribonukleáz A és T fehérjék esetén. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezek a fehérjék nem aggregálódnak még a hődenaturált állapotukban sem. Az említett szerzők a frekvencianövekedést azzal magyarázták, hogy az oldószernek kitett tirozin gyengébb hidrogénhid kötést létesít, mint a fehérjében eltemetett tirozin. Mi ennek ellenkezőjét tapasztaltuk, ami arra utal, hogy az aggregátumban a tirozin hidrogénhid erősebb. Ez egyben azt is jelenti, hogy a G és H hélixek a hődenaturáció során teljesen széttekerednek, ellentétben a hideg- és a nyomás-denaturáció esetén tapasztaltakkal. A hődenaturáció teljesen irreverzibilis, a mintát szobahőmérsékletre visszahűtve az aggregációra jellemző sávok megmaradnak, és az amid sáv közepének széles (rendezetlen szerkezetre jellemző) jellege sem változik.

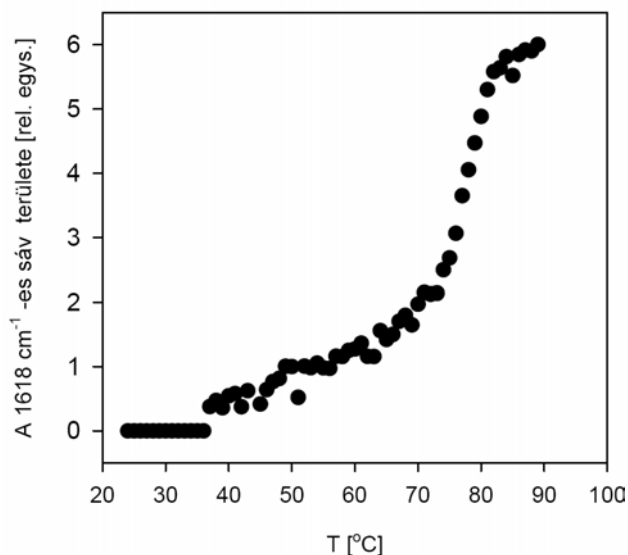
4.5.5. A hideg-, nyomás- és hődenaturáció összehasonlítása

A hődenaturáció egyértelműen eltér a másik két denaturációtól az azt szorosan követő aggregáció tekintetében. A hideg és a nyomás-denaturáció közti különbséget még két kísérlettel próbáltuk felderíteni.

Az első kísérletben a nyomásdenaturált fehérjét hűtöttük jóval hideg-denaturációs hőmérséklet alá. Ekkor a spektrum nem változott szignifikánsan, ami azt mutatja, hogy a nyomás-denaturáció után részlegesen újraterjedett konformáció és a hidegdenaturált állapot nagyon hasonló szerkezetű. Ez megerősíti a hidegdenaturált állapot és a folding intermedier közti már feltételezett hasonlóságot.

A második kísérletben a hideg-denaturált fehérjét melegítettük. Korábbi méréseinkből már ismert volt (ld. 3.4. fejezet), hogy a nyomás-denaturáción átesett fehérje olyan intermedier állapotba kerül, amely már a hődenaturációs hőmérséklet alatt is elkezd aggregálódni. Arra voltunk kíváncsiak, vajon a hidegdenaturált fehérje is hasonló intermedier állapotban van-e a hideg-denaturáció után. A 43. ábra mutatja, hogy az aggregációt jelző 1618 cm^{-1} -es sáv már 40°C alatt megjelenik, és intenzitása tovább növekszik a hőmérséklettel, majd a teljes nagyságát a hődenaturáció után éri el. A fehérje aggregációra való hajlama tehát a nyomás- és a hideg-denaturáció után

szinte teljesen megegyezik, ami megint azt mutatja, hogy a nyomás és a hideg-denaturáció hasonló mértékű szerkezetváltozást jelent.



43. ábra. A lószív mioglobín 1618 cm⁻¹-es oldalsávjának területe a hideg-denaturációt követő fűtés során.

A hideg- és nyomás-denaturáció további közös tulajdonságára bukkanhatunk, ha az elliptikus fázisdiagram fenomenológikus elméletében szereplő, a denaturációhoz tartozó szabad-entalpia-változást analizáljuk. Eszerint mindkét folyamatban a térfogatváltozás hajtja a folyamatot, szemben a hődenaturációval, amiben az entrópiaváltozásnak van meghatározó szerepe. A denaturációnak erre a termodinamikai oldalára a 7. tézispontban még visszatérek.

Összegezve: FTIR spektroszkópiai mérésekkel összehasonlítottuk a lószív mioglobín hideg-, hő- és nyomásdenaturált állapotait. Megállapítottuk, hogy a hideg-denaturáció során az alfa hélix szerkezet kooperatív módon csökken, az átalakulás 12,7±0,4°C-on történik. A hidegdenaturált állapotban a fehérjeszerkezet belső magja nem veszíti el a szerkezetét. A nyomás-denaturáció során megállapítottuk, hogy az alfa hélix szerkezet mennyisége a fehérjében két lépésben csökken, 403±3 MPa és 590±5 MPa nyomásokon. Megállapítottuk, hogy mind a hideg-, mind pedig a nyomás-denaturáció részlegesen reverzibilis.

A mioglobín hő-denaturációja során a másodlagos szerkezet változása éles szigmoid görbét mutatott, aminek középpontja 72,3 °C-nál volt. A hődenaturált fehérje intermolekuláris antiparallel béta-szerkezettel aggregálódott.

Megállapítottuk, hogy a hideg-denaturáció után részlegesen visszatekeredett fehérje a nyomás-denaturációs cikluson átesett fehérjéhez hasonlóan fokozott aggregációs hajlamú.

A három denaturációt összehasonlítva megállapítottuk, hogy a nyomás- és hideg-denaturáció után kialakuló szerkezetek nagymértékben hasonlóak, de eltérnek a magas hőmérsékleten kialakulttól, amely a legkevesebb másodlagos szerkezetet tartalmazza. Rámutattunk, hogy az elliptikus fázisdiagram fenomenológikus elmélete szerint a nyomás- és hideg-denaturációt a térfogatváltozás, míg a hődenaturációt az entrópiaváltozás hajtja.

4. 6. A tormaperoxidáz enzim stabilitásának szerkezeti alapjai és a szerkezeti módosulatoknak a fehérje aggregációs hajlamával való kapcsolata. (T6, P15, P18)

A tormaperoxidáz (HRP) másodlagos szerkezetének nagy nyomás hatására bekövetkező változását mértük infravörös spektroszkópiával. Különbözőképpen gyengített szerkezetű fehérje-módosulatokat vizsgáltunk, hogy eldöntsük, mi okozza a tormaperoxidáz szokatlanul nagy nyomásstabilitását. A hat fehérjeforma amit vizsgáltunk: a natív, az apo-, a Ca^{2+} -szegény, a fémmentes mezoporfirinnel (MP) helyettesített (MPHRP), a benzohidroxámsavat (BHA) mint szubsztrátot kötött forma, valamint egy olyan változat, ahol a diszulfid hidakat (ditioeritriollal (DTE)) redukáltuk.

4.6.1. A tormaperoxidáz nyomás-denaturációja

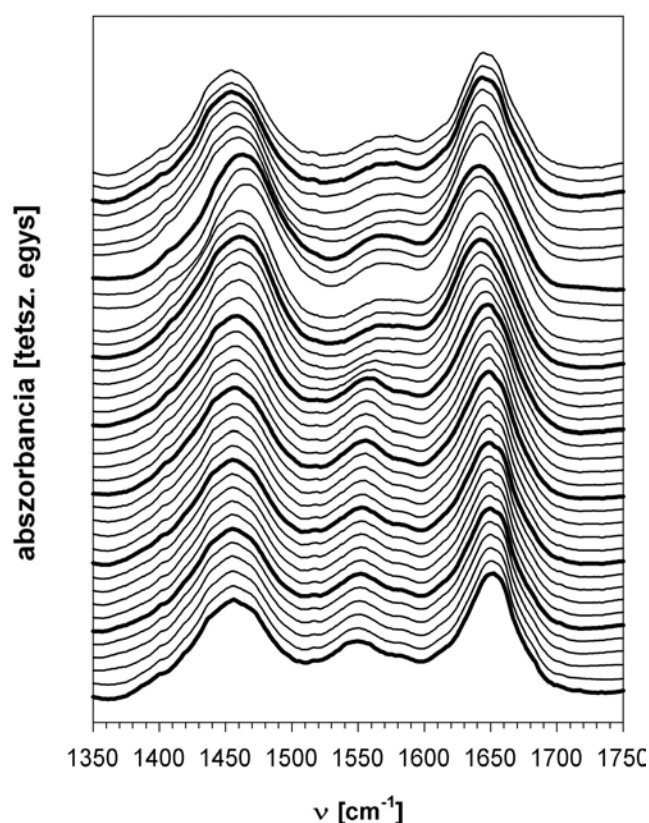
A 44. ábra mutatja a natív tormaperoxidáz infravörös spektrumát a nyomás függvényében, az amid I és az amid II/II' sávok tartományában. (A különböző nyomásokon mért spektrumok el vannak tolva függőlegesen a jobb áttekinthetőség kedvéért.). Talán a legfeltűnőbb jelenség ezen az ábrán az amid II sáv (1550 cm^{-1}) eltűnése 1 GPa és 1,4 GPa között. Ezzel egyidejűleg az amid I sáv is eltolódik az alacsonyabb hullámszámok felé, valamint az amid I sáv kiszélesedése is megfigyelhető. Ezek egyértelműen a fehérje denaturációjára utalnak. A fehérje stabilitásának jellemzésére az amid I sáv maximumának pozícióját használtuk fel. Bár egyedül a maximum pozíció alkalmazása elfedheti az átalakulás kezdeti folyamatait, például amikor egy növekvő komponens még nem elég intenzív ahhoz, hogy a teljes sáv maximum pozícióját eltolja, a stabilitás jellemzésére ez a paraméter

alkalmas, hiszen a denaturációkor a natív komponens teljesen eltűnik, a rendezetlen komponens pedig uralja az amid I sáv tartományát, ezért az amid sáv maximuma is változik. A maximum pozíciót a már ismertetett szigmoid görbével illesztettük, amelynek a $p_{1/2}$ paraméterét használtuk fel az egyes tormaperoxidáz változatok stabilitásának jellemzésére.

A 45. ábra mutatja a natív ill. a fémmentes porfirint tartalmazó tormaperoxidáz amid sávjának pozícióját a nyomás függvényében. A kezdeti lassú csökkenés után a pozíció stabilizálódik, majd 1 GPa felett a denaturált szerkezetre

jellemző 1642 cm^{-1} -hez tart. Az ábrán látszik, hogy nincs szignifikáns különbség a natív és a fémmentes porfirint tartalmazó fehérje között a nyomásstabilitást illetően. A VII. táblázat foglalja össze a denaturációs nyomásokat a különböző tormaperoxidáz módosulatok esetén.

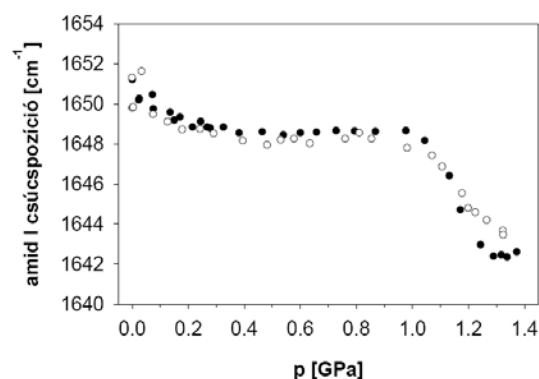
A natív állapot szerkezetének vizsgálatára, illetve az szubdenaturációs nyomástartományban végbemenő elasztikus változások követésére a spektrumot felbontásnövelő eljárásnak, a már ismertetett Fourier öndeconvolúciónak (ld.: 2.2.4.) vetettük alá. A dekonvolvált spektrumok a 46. ábrán láthatók.



44. ábra. A HRP infravörös spektrumának részlete (függőlegesen eltolva). A nyomások (alulról): **0,05**; 0,08; 0,13; 0,19; 0,20; **0,22**; 0,27; 0,30; 0,32; 0,33; **0,38**; 0,43; 0,52; 0,59; 0,65; **0,71**; 0,78; 0,85; 0,92; 1,03; **1,10**; 1,19; 1,22; 1,30; 1,34; **1,37**; 1,39; 1,43; 1,27; 1,12; **1,03**; 0,89; 0,73; 0,50; 0,31; **0,19**; 0,07; 0,05 GPa. ($T=25^{\circ}\text{C}$)

A natív fehérje amid I sávjában két fő komponens található: 1646 cm^{-1} -nél, ill. 1659 cm^{-1} -nél. Ez utóbbi egyértelműen a helikális szerkezethez rendelhető, míg az 1646 cm^{-1} -es csúcs a rendezetlen szerkezetre jellemző tartományban van. A kapott területarányokat összehasonlíthatjuk a röntgen-kristallográfiai adatokkal (Gajhede, 1997). A PDB adatbázisban szereplő szerkezet 51%-ban helikális

(44% α -hélix, 7% 3_{10} hélix), nagyon kevés β -lemez (2%) található benne, és az aminosavak 47%-ához nem rendelhető α - vagy β -szerkezet, ezek az aminosavak a hélixeket összekötő rövidebb-hosszabb hurkokat alkotják, melyek egy része rendezetlen szerkezetű. Az általunk kapott 1659 cm^{-1} -es komponens Gauss-görbe alatti területe azonban csak az amid I sáv területének 29%-át teszi ki. Ez jelentősen kevesebb, mint a kristályszerkezet által jósolt mennyiség. Ha azonban figyelembe vesszük, hogy az α -hélixben az i -edik aminosavnak a fehérje gerincéhez csatlakozó oxigénje az $i+4$ -ik aminosavval alkot hidrogénhidat, akkor világos, hogy a hélixek végén található négy aminosav oxigénje már nem tud hélixen belüli hidrogén-kötést létrehozni. Vizes oldatban található fehérje esetén ezek a vízzel alkotnak



45. ábra. A natív ● ill. a fémmentes porfirint tartalmazó ○ tormaperoxidáz amid I sávjának pozíciója a nyomás függvényében.

VII. Táblázat.

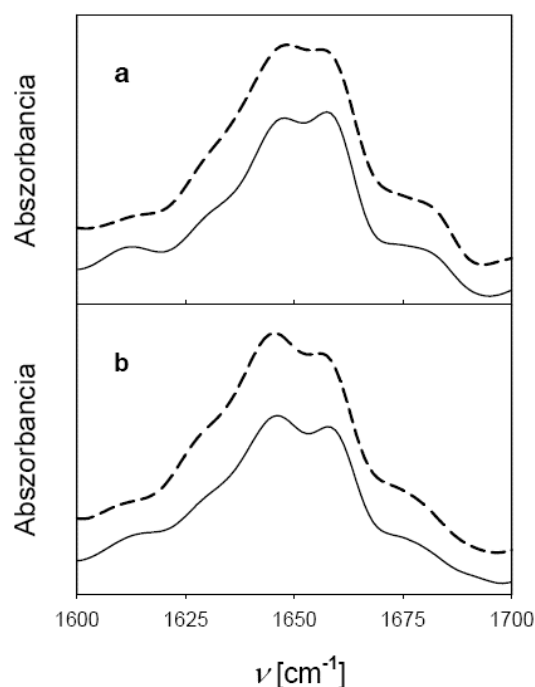
A különböző tormaperoxidáz variánsok — az amid I sáv maximumának pozíciójából meghatározott — denaturációs nyomásai, valamint az amid I sáv két fő komponensének arányai.

HRP variáns	$p_{1/2}$ [GPa]	A_{1659}/A_{1647}
natív	$1,20 \pm 0,01$	0,85
fémmentes porfirines (MPHRP)	$1,17 \pm 0,07$	0,50
apo	$1,04 \pm 0,04$	na.
Ca^{2+} -szegény (natív+EDTA)	$1,00 \pm 0,01$	0,80
natív+BHA	$1,08 \pm 0,01$	0,98
DTE-vel redukált diszulfid hidak	$0,95 \pm 0,03$	0,66

hidrogénhidat. Ha ezeket az aminosavakat levonjuk, akkor a hélixen belüli kötést alkotni képes aminosavak száma 88, ami a molekulát alkotó 306 aminosavnak épp a 29%-a. Ezt az interpretációt támasztja alá az is, hogy Dusseau és Pezolet (1990) azt tapasztalták, hogy a másodlagos szerkezet predikciója javult, ha a hélixek két szélső aminosavát nem számították a hélixhez. Ezeket „rendezetlen hélix” szerkezetűnek tartották. Bár matematikailag a kétfajta interpretáció ugyanarra az eredményre vezet, a mi értelmezésünk konkrét fizikai képen alapul, ellentétben Dusseau és Pézolet fenomenologikus magyarázatával.

A 3_{10} hélixek többsége nagyon rövid, csak egyikükben található 6 belső hidrogénhid, így a 1665 cm^{-1} -nél várt komponens olyan kis intenzitású, hogy az intenzív 1659 cm^{-1} -es komponens elfedi. A hajlatok adják egyrészt a 1680 cm^{-1} -nél látható sávot, valamint a hosszabb, rendezetlen hajlatok a már ismertett rendezetlen komponenshez járulnak hozzá.

A fehérje nyomás-denaturációját nem csak az amid I sáv eltolódása, hanem azzal párhuzamosan a H/D kicserélődés menetéről információt adó amid II sáv (1550 cm^{-1}) intenzitása is mutatja. A fehérjét szokásunkhoz híven egy éjszakán keresztül hagytuk nehézvízes oldatban kicserélődni, tehát a könnyen kicserélhető hidrogének már lecserélődtek deutériumra. A fehérje stabil magjában (belső, merev doménjében) levő hidrogének kicserélődése a denaturációval egyidejűleg történik, ahogy ez a 44. ábra spektrumaiból is látszik. A merev belső mag létezését később molekuláris



46. ábra. A natív (—) ill. a fémmentes porfirint tartalmazó (---) tormaperoxidáz dekonvolvált spektrumai az amid I sávban. a: atmoszferikus nyomáson, b: 0,5 GPa. A dekonvolúciót 20 cm^{-1} -es félértékszélességű Lorentz függvénnel végeztük, ami 1,5-szörös felbontásnövekedést eredményezett.

dinamikai számolások is megerősítették. Meg kell jegyezni, hogy a fehérje dinamikáját vizsgálva (ld. előző tézispont) teljesen más jelegű mérésekkel azt tapasztaltuk, hogy a fehérje kompresszibilitása eltérő a MPa és a GPa tartományokban, amit szintén a fehérjében levő merev, nehezen összenyomható, kövekezésképpen alacsony dinamikájú domén létezésével magyaráztunk.

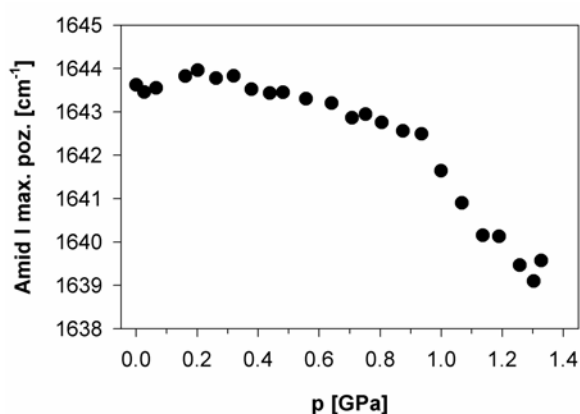
A fehérjén a denaturációs érték alatti nyomás hatása is megfigyelhető. A 46. ábrán a dekonvolvált spektrum 0,5 GPa nyomás hatására bekövetkező változása látható. A rendezetlen és a hélix szerkezetek aránya megváltozik a rendezetlen javára, ahogy ez az 1647 cm^{-1} -es és 1659 cm^{-1} -es komponensek arányából kitűnik. Ezen a nyomáson azonban nincs változás az amid II sávban, ami egybeesik azzal az eddig felállított képünkkel, hogy a fehérje egy merev és egy flexibilisebb doménből áll. Alacsony (< GPa) nyomáson a fehérje flexibilisebb doménje elasztikusan deformálódik, a merev domén szerkezete pedig csak a molekula teljes kitekeredésénél (1,2 GPa-on) változik.

4.5.2. A fémmentes mezoporfirint tartalmazó HRP (MPHRP)

A fémmentes mezoporfirint tartalmazó fehérje stabilitási nyomása nem különbözik szignifikánsan a natívétól (VII. tábl., 45. ábra). Az amid I sáv maximum pozíciója sem tér el lényegesen a vizsgált nyomástartományban a natív fehérjétől. A dekonvolvált spektrumokat analizálva azonban a fémmentes porfirinnel történő helyettesítés hatása látható. A 1659 és 1646 cm^{-1} -es komponensek aránya csökken a helyettesítés hatására, azaz kevesebb lesz a helikális szerkezet. A nyomást növelve azonban ez a különbség csökken, 0,5 GPa-nál már eltűnik és az arány a 0,5 – 0,9 GPa tartományban megegyezik a natív és a helyettesített fehérje esetében. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a porfirin a flexibilisebb doménban található, így azt perturbálja a helyettesítés is. Mivel a nyomás is ennek a doménnek a szerkezetét változtatja meg legerőteljesebben, a nyomás növekedésével a helyettesítés destabilizáló hatása eltűnik.

4.6.3. Apo-tormaperoxidáz

A hem csoport eltávolításával előállt apo-HRP esetén azt vártuk, hogy a stabilitás lényegesen csökken, ugyanúgy, mint az apomioglobin esetén. A másodlagos szerkezet már atmoszferikus nyomáson jelentősen eltér a natív fehérjétől, amit az amid I maximum pozíciójának 1651 cm^{-1} -ről 1644 cm^{-1} -re való eltolódása is mutat (47. ábra). Az amid sávot nem lehetett megbízhatóan



47. ábra Az apo-tormaperoxidáz amid I sávjának maximum pozíciója a nyomás függvényében.

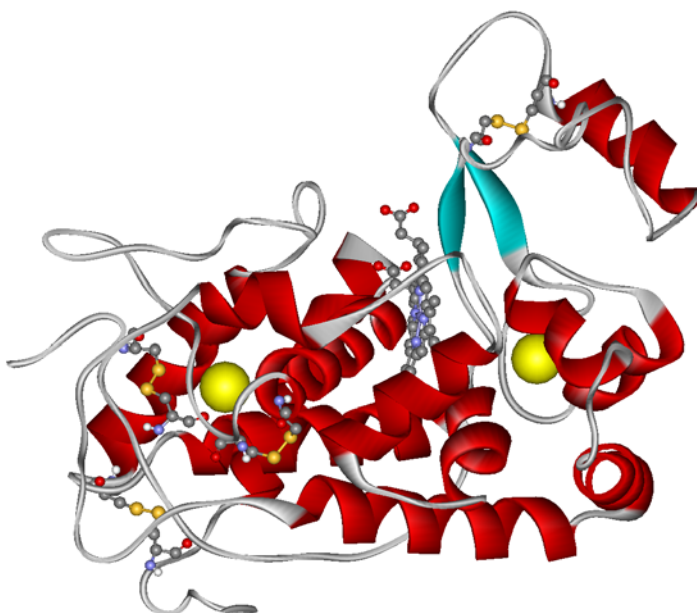
felbontani 1646 cm^{-1} -es és 1659 cm^{-1} -es komponensekre. A fehérje atmoszferikus nyomáson kis mértékben aggregálódott is, amit a megjelenő 1616 cm^{-1} ill. 1685 cm^{-1} -es csúcsok mutattak. Ennek ellenére a fehérje nem volt denaturált állapotban atmoszferikus nyomáson, amint az a továbbiakból egyértelműen kitűnik. 0,2 GPa nyomáson az aggregátumok disszociálódtak, de a teljes denaturáció csak 1,04 \pm 0,04 GPa-nál következett be, amit az amid I sáv pozíciójának további csökkenése mutat.

A jelenség jól értelmezhető a merev és flexibilis doméneket tartalmazó már ismertett modellünkkel. A hem eltávolítása jelentősen destabilizálja a fehérje flexibilis doménjét. Ezért az apo-fehérjében sokkal kevesebb a rendezett másodlagos szerkezet. A natív fehérjében a porfirin egy ún. zsebben, azaz üregben helyezkedik el, ahol másodlagos kötésekkel a polipeptid lánchoz kötődik. A porfirin hiányában ez a fehérjerész nem tud megfelelően feltekeredni, és a natív szerkezetet felvenni. (Az apofehérjét ui. úgy készítik, hogy a hem csoportot kémiaiilag denaturált fehérjéből távolítják el. Az apo-fehérje a denaturálószer kidializálása után spontán módon felgombolyodik). A HRP-nek az apomioglobinnál jóval nagyobb stabilitását az okozhatja, hogy a mioglobin mérete feleakkora, mint a HRP-é (153 ill. 306 aminosavból épülnek fel), ezért az a belső mag, amit a mioglobin denaturációjánál tárgyaltunk (39. ábra) túl kicsi lehet a fehérje stabilizálásához. Ez a mioglobin esetén

a nyomásstabilitás már említett drasztikus csökkenéséhez vezet (150 MPa az apofehérjénél, ami mintegy negyede a holofehérje stabilitásának). A tormaperoxidáz merev magja azonban elég nagy ahhoz, hogy 1 GPa-ig stabil maradjon, akkor is, amikor a hozzá kapcsolódó flexibilisebb domén elvesztette a szerkezetét.

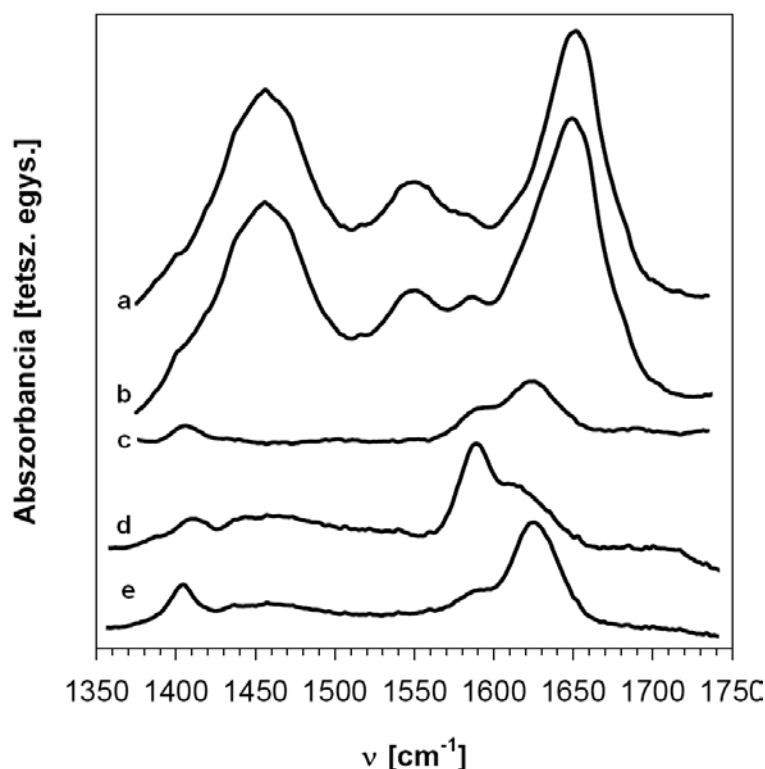
4. 6. 4. Csökkentett Ca^{2+} -tartalmú fehérje

A tormaperoxidáz térszerkezetét két Ca^{2+} ion stabilizálja (48. ábra), amelyek szükségesek a megfelelő felgombolyodáshoz, valamint a fehérjén belül a hem csoport számára kedvező környezet megteremtéséhez (Smith, 1990). Az irodalomban azóta is nagy vita tárgyát képezi, hogy egyáltalán lehet-e teljesen Ca^{2+} -mentes tormaperoxidázt készíteni, vagy csak az egyik Ca^{2+} ion távolítható el a fehérjeszerkezet teljes lerombolása nélkül. Mi a legegyszerűbb módszert alkalmaztuk a fehérje Ca^{2+} -tartalmának csökkentésére, az oldathoz etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA-t) adtunk, amely a Ca^{2+} ionokkal sokkal stabilabb komplexet alkot, mint a fehérje. A Ca^{2+} -nak az EDTA-hoz való kötődését a karboxilát csoport szimmetrikus és aszimmetrikus nyújtási rezgései révén lehet detektálni (Kaposi és mtsai, 1999). Ezek jól megfigyelhetők a 49. ábra *d* és *e* görbéin. A Ca^{2+} -mentes EDTA rezgései



48. ábra. A tormaperoxidáz szerkezete. A stabilitáshoz hozzájáruló Ca^{2+} ionok (nagy sárga gömbök) ill. a diszulfid hidakat alkotó cisztein aminosavak is fel vannak tüntetve.

1404 cm^{-1} -nél valamint 1624 cm^{-1} -nél vannak, míg a kalciumot kötő EDTA rezgései 1406 cm^{-1} és 1588 cm^{-1} értékre tolódnak el. A 49. ábra *a* és *b* görbéi mutatják a HRP spektrumát EDTA nélkül, és EDTA-val, vagyis a natív (molekulánként kettő kalciumot tartalmazó) ill. a csökkentett Ca^{2+} -tartalmú fehérje spektrumát. A *c* görbén látható különbségi



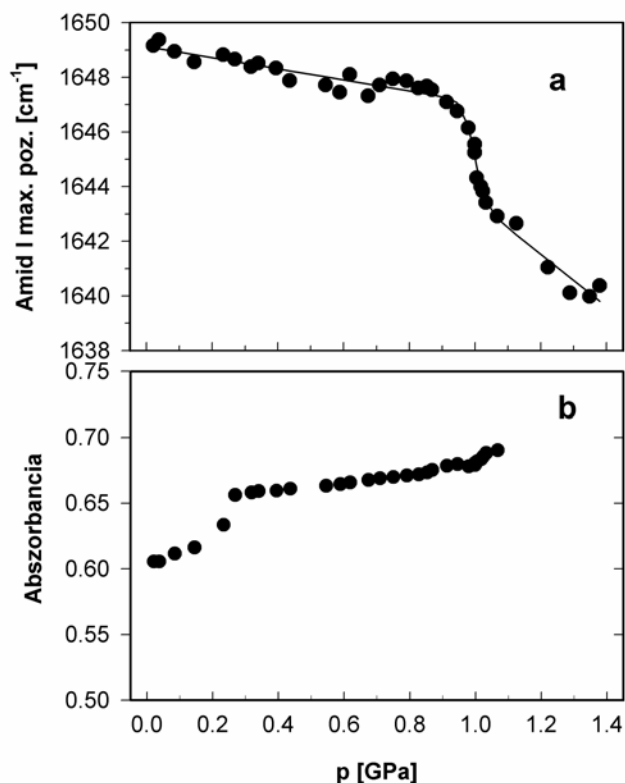
49. ábra. a) Ca-ot tartalmazó natív HRP, b) Ca-szegény HRP infravörös spektruma, c) az előzőek különbsége (b-a), d) EDTA+CaCl₂ (1:2 molarány) e) EDTA infravörös spektruma.

spektrum (*b-a*), mutatja az EDTA hatását. Ez a különbségi spektrum három csúcsot tartalmaz, az 1404, 1588 és 1624 cm⁻¹ hullám-számoknál. Mivel a fehérjéhez adott EDTA moláris koncentrációja tízszer nagyobb, mint a fehérjéé, az EDTA nagy része Ca²⁺-mentes állapotban van. Ha a *c* spektrumot a *d* és *e* spektrumok lineáris kombinációjaként állítjuk elő, akkor az EDTA telítettségére 20 % jön ki, ami azt jelenti,

hogy a fehérje mindkét Ca²⁺ ionját eltávolítottuk. Ez azonban valószínűleg felső becslés, mivel más mérésekből tudjuk, hogy a második Ca²⁺ eltávolítása sokkal bonyolultabb biokémiai eljárásokat igényel (Szigeti és mtsai publikálatlan eredmény, személyes közlés).

Az EDTA hozzáadásával az amid I sáv pozíciója nem változott, ami megfelel a korábbi irodalmi eredményeknek. A 1646 cm⁻¹-es és 1659 cm⁻¹-es sávok arányának növekedése azonban a fehérjeszerkezet részleges elvesztését mutatja a Ca²⁺-hiány hatására. A fehérje stabilitása jelentősen csökken, 1,00 ± 0,01 GPa értékre (49. ábra). Az amid I maximum pozícióhoz teljesen hasonlóan változik a H/D kicserélődést jelző amid II sáv intenzitása is, azaz a kicserélődés csak a denaturációs nyomáson megy végbe. Megjegyzendő még, hogy az 1588 cm⁻¹-es sáv, ami a Ca²⁺-nak az EDTA-hoz való kötődését mutatja, ugrásszerűen megnő 0,2 GPa-nál (50. ábra). Ezt úgy interpretálhatjuk, hogy a nyomás hatására itt a harmadlagos fehérje-

szerkezet annyira torzul, hogy a második, stabilabban kötött Ca^{2+} is kiléphet a fehérjéből. A fehérje másodlagos szerkezetének ugrásszerű változására utaló jelenség ennél a nyomásnál az amid I sávban nem található.

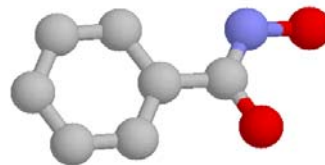


50. ábra. a: A Ca-szegény HRP amid I sávjának maximuma a nyomás függvényében. b: Az 1588 cm^{-1} -nél mért abszorbancia a nyomás függvényében.

4.6.5. Szubsztrátkötés hatása a HRP stabilitására

A tormaperoxidáz enzim hem-zsebébe számos aromás szubsztrát molekula tud bekötni. Ezek közül az egyik gyakran tanulmányozott a benzohidroxámsav (BHA) (51. ábra). A röntgen-krisztallográfiai adatok szerint a fehérje térszerkezete nem változik szignifikánsan a BHA bekötődésekor. A szubsztrátkötésnek a szerkezet stabilitására kifejtett hatása nem egyértelműen tisztázott. Közhiedelem, hogy a szubsztrát kötődése stabilizálja az enzimet, azonban újabban ennek az ellenkezőjéről is jelentek meg adatok az irodalomban. Például neutronszerkezet vizsgálata, valamint molekuláris dinamikai számítások szerint, ha a dihidrofolát-reduktáz-NADPH komplexhez a metotrexát hatóanyag molekula kötődött, a kis frekvenciájú kollektív molekularezgések populáltsága megnövekedett, ami azt mutatja, hogy a molekula szerkezete fellazult (Balog és mtsai, 2004, Balog személyes közlés).

A szubsztrátkötésnek a fehérjére kifejtett stabilizáló vagy destabilizáló hatása tehát mindenképpen tudományos érdeklődésre számot tartó probléma.



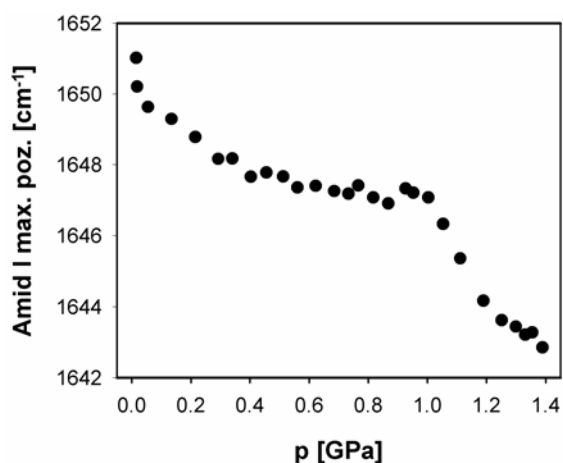
51. ábra. A benzohidroxámsav szerkezete (C szürke, N kék, O piros, H nincs ábrázolva).

Az infravörös spektrumon nem látszik olyan szignifikáns változás, amit a szubsztrát hatásának lehetne betudni. Az amid sáv maximum pozíciója

sem változik. A dekonvolvált spektrum két fő

komponensének aránya kissé megváltozik, mégpedig úgy, hogy a rendezett struktúrához tartozó 1659 cm^{-1} -es sáv növekszik meg. Ez egybeesik azzal, hogy a röntgenkristallográfiai méréseknél két α -hélix meghosszabbodását tapasztalták (Henriksen és mtsai, 19998). A BHA-kötött fehérje nyomásstabilitása a natív és a Ca-szegény fehérjéé közé esik. Az 52. ábra mutatja az amid I sáv maximum pozícióját a nyomás függvényében. Az eddigiekből is látszik, hogy a BHA bekötődésnek a fehérje stabilitására való hatása eléggé különös. Egyrészt az atmoszferikus nyomáson a szerkezet stabilizálódása látszik, másrészt pedig a

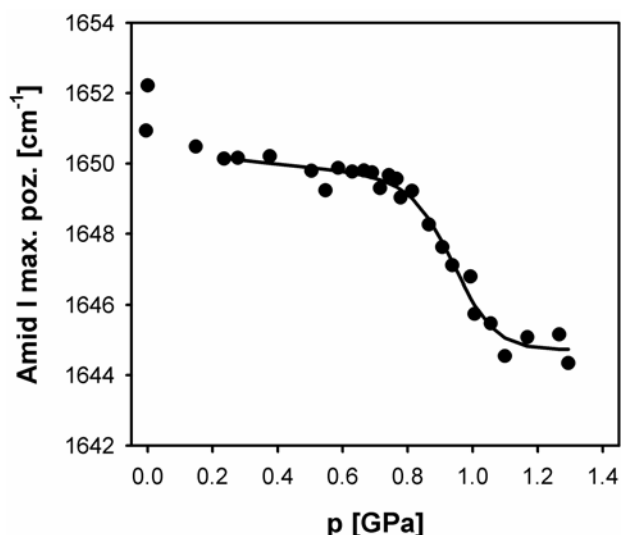
nyomásstabilitás – ha nem is jelentősen, de – csökken. A magyarázat megint a kétdomén szerkezeti hipotézis alapján lehetséges. Elképzelésünk szerint a fehérje flexibilisebb doménje stabilizálódik atmoszferikus nyomáson, azonban ez az a domén, ami kisebb nyomásstabilitású, így nagy nyomáson a stabilizáló szerep nem érvényesül.



52. ábra. A BHA-t kötött HRP amid I sávjának maximum pozíciója a nyomás függvényében.

4.6.6. A diszulfid hidak redukálásának hatása a HRP stabilitására

A fehérje térszerkezetének stabilizálásában négy diszulfid híd vesz részt, amelyek a Cys¹¹-Cys⁹¹, Cys⁴⁴-Cys⁴⁹, Cys⁹⁷-Cys³⁰¹, Cys¹⁷⁷-Cys²⁰⁹ aminosavak között épülnek fel. A diszulfid hidak ditioeritritollal redukálhatók, azaz felszakíthatók. Ennek következtében a fehérje-stabilitás csökkenését várjuk. Az amid I sáv maximuma nem tükrözi ezt a várakozást (53. ábra), de a dekonvolvált spektrumból már egyértelműen látszik a rendezetlen szerkezet növekedése (VII táblázat). Az amid sáv maximumából számított nyomásstabilitás 1 GPa alatti, a legkisebb az összes



53. ábra. A diszulfid hidak redukálásával kapott HRP változat amid I sávjának maximum pozíciója a nyomás függvényében.

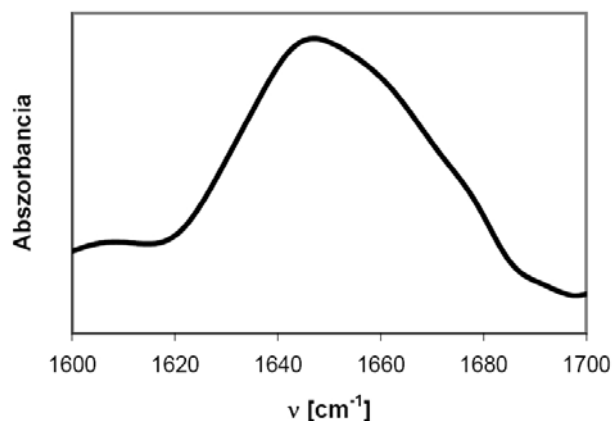
variáns között. Ez azonban még mindig sokkal nagyobb érték, mint amit egy átlagos fehérjénél tapasztalhatunk. Nem szabad elfelejtenünk azonban, hogy a diszulfid hidak elsősorban a harmadlagos szerkezetet stabilizálják, viszont az infravörös spektroszkópia a másodlagos szerkezetre érzékeny. Denisov és mtsai (1999) is azt tapasztalták, hogy a diszulfid hidak felszakítása nagyobb flexibilitású állapothoz vezet, míg a szerkezet kevésbé változik. A diszulfid hidak felhasítása okozta a legnagyobb stabilitáscsökkenést, amit még nyomatékosít az a megfigyelés is, hogy az atmoszferikus nyomásra visszatérve kizárólag ennél a módosulatnál figyeltünk meg az intermolekuláris β -szerkezetre jellemző oldalsávokat az amid I tartományban (1616 és 1685 cm⁻¹).

Meg kell jegyezni, hogy a tormaperoxidáz enzim egy glikolizált fehérje, azaz a fehérjét nyolc, hozzá kovalensen kötődő cukorlánc fedi. Ezek is jelentősen hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a fehérje a diszulfid kötések felszakítása után sem veszti el a stabilitását.

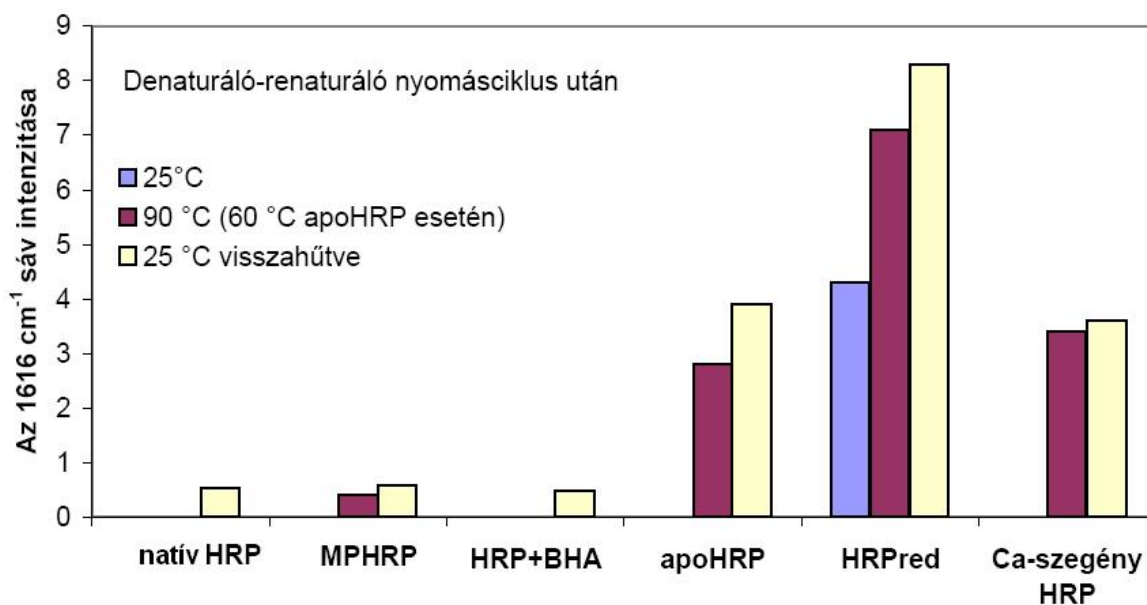
4.6.7. A tormaperoxidáz aggregációra való hajlama denaturáló nyomásciklus után.

A tormaperoxidáz stabilitása abban is megmutatkozik, hogy a hődenaturált HRP számos más fehérjével ellentétben nem képez aggregátumot. Ezt az 1616 cm^{-1} -es és 1685 cm^{-1} -es sávok hiánya jelzi a magas hőmérsékleten mért infravörös spektrumban (54. ábra). Megvizsgáltuk, hogy az előzőekben tárgyalt szerkezeti módosítások hogyan befolyásolták az aggregációs hajlamot.

A nyomás-denaturációs cikluson átesett fehérjét ugyanolyan hőmérsékleti ciklusnak vetettük alá, mint a mioglobint (ld. 4.3. fejezet). Arra voltunk kíváncsiak, hogy a nyomás-denaturáció utáni



54. ábra. A tormaperoxidáz amid I sávja a hődenaturált állapotban 90°C -on.



55. ábra. Az 1616 cm^{-1} -es sáv intenzitása a különböző HRP módosulatok esetén 25°C -on kivitelezett nyomásciklus után közvetlenül, majd 90°C -ra való melegítés esetén, ill. 25°C -re visszahűtve. (HRPred: redukált diszulfid hidakat tartalmazó HRP.)

újragombolyodott állapot mennyire hajlamos aggregációra.

Az 55. ábra mutatja az aggregációra jellemző 1616 cm^{-1} -es sáv intenzitását (görbe alatti területét) a különböző HRP variánsok esetén. A hat HPR módosulat két csoportra osztható. A natív, a mezoporfirinnel helyettesített (MP-HRP), ill. a szubsztrát-kötött (HRP+BHA) formák nem aggregálódnak szignifikáns mértékben, ami azt mutatja, hogy a szerkezet ezekben a formákban nem sérült jelentősen, és a nyomásciklus után a natív vagy ahhoz nagyon közeli állapotba gombolyodnak vissza. Ezt erősíti meg az infravörös spektrum is, amely nem mutat jelentős eltérést a nyomásciklus hatására.

A másik csoportba tartozó variánsok olyan intermedier formába gombolyodnak vissza, amely aggregációra képes. Megfigyelhetjük, hogy ide azok a fehérjék tartoznak, amelyek esetében a nyomásstabilitás is jobban csökkent.

A nyomásciklus után közvetlenül csak a redukált HRP aggregálódik. A diszulfid hidak felszakítása okozza tehát a leglabilisabb szerkezetet. Felmerül a kérdés, hogy ha ez a forma ilyen labilis, hogyan tudott a nyomás-denaturációnak ellenállni majdnem 1 GPa nyomásig. Ennek egy lehetséges magyarázata az, hogy nem az összes diszulfid híd volt elérhető a DTE számára a natív állapotban, egyes diszulfid hidak redukálása csak a fehérje elasztikus deformációja során a denaturációhoz közeledve következett be. Ezért a denaturáció után visszatekeredett fehérje nem volt azonos a kiinduló fehérjével.

Az apoHRP és a Ca-szegény fehérje hasonlóan aggregálódik a nyomásciklus után. Ezek a fehérjék hasonlóan viselkednek, mint a natív (nem nyomáskezelt) mioglobin, azaz magas hőmérsékleten denaturálódás közben aggregálódnak, és az aggregátumok stabilak maradnak szobahőmérsékletre visszahűtve is.

Összefoglalva, a HRP különböző módosulatainak denaturációs stabilitási sorrendje a következő: natív HRP, MP-HRP, apo-HRP, BHA szubsztrátot kötött HRP, Ca^{2+} -szegény, DTE-vel redukált fehérje.

Az amid I és II sávok részletes analízise alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a fehérjének egy merevebb és egy flexibilisebb doménje van. Ez utóbbi tartalmazza a hem zsebet is. Az amid sáv két fő komponensének (1659 cm^{-1} és 1647 cm^{-1})

értelmezésénél rámutattunk, hogy a röntgenkristallográfiával meghatározott másodlagos szerkezeti elem arányok nem vihetők át direkt módon az infravörös spektrumokra, ugyanis az FTIR csak a belső aminosavakat érzékeli helikális szerkezetűnek. Ezen felismeréssel sikerült az infravörös és a kristallográfiai adatok összhangját megteremteni.

A nyomáskezelésen átesett fehérjék esetén csak az apoHRP, a Ca-szegény és a redukált HRP mutatott jelentős aggregációt, ami összhangban van azzal, hogy ezek a módosítások okozták a nyomásstabilitás legnagyobb mértékű csökkenését is.

Eredményeink alapján összegezve megállapíthatjuk, hogy a stabilitásban a diszulfid hidak szerepe a legjelentősebb. A porfirin és a Ca^{2+} ionok jelenléte további, de az előbbinél gyengébb stabilizáló hatással bír.

4.7. A fehérjék elliptikus fázisdiagramjának kiterjesztése, az aggregált és intermediér állapotok figyelembevétele a fázisdiagramon. (T7, P4, P13, P20)

Amint azt már említettük, a fehérjék klasszikus elliptikus nyomás-hőmérséklet fázisdiagramja (Hawley 1971) nagyon leegyszerűsített leírását adta a fehérje denaturációjának.

4.7.1. Az elliptikus fázisdiagram alakját befolyásoló paraméterek

Első lépésben azt kezdtük vizsgálni, hogy hogyan hatnak a fehérjének a Hawley-féle leírásban szereplő különböző termodinamikai paraméterei az ellipszis alakjára, ill. a denaturációs nyomásra és hőmérsékletekre, utána pedig azt, hogy a denaturált és natív állapot közti szabadentalpia-különbség függvény (ΔG) másodrendnél magasabb rendű tagjai hogyan befolyásolják a fázisdiagram alakját.

A Hawley-féle fenomenologikus termodinamikai leírás a denaturált és a natív állapot közti szabadentalpia különbséget ($\Delta G = G_{\text{denaturált}} - G_{\text{natív}}$) írta fel a szabadentalpia második deriváltjaival egy tetszőlegesen választott T_0, p_0 pont környezetében:

$$\Delta G = \frac{\Delta\beta}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\alpha(p - p_0)(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) - \Delta S_0(T - T_0) + \Delta G_0 \quad (37)$$

ahol $\beta = (\partial V / \partial p)_T$ az ún. kompresszibilitási faktor, $\alpha = (\partial V / \partial T)_p = -(\partial S / \partial p)_T$ a hőtágulási együttható, $C_p = T(\partial S / \partial T)_p$ pedig az állandó nyomáson mért fajhő.

Amennyiben a szabadentalpia második deriváltjai függetlenek a hőmérséklettől illetve a nyomástól, akkor a fázisátalakulási (azaz denaturációs) görbére a $\Delta G = 0$ egyenletből egy másodrendű görbe adódik, ami a

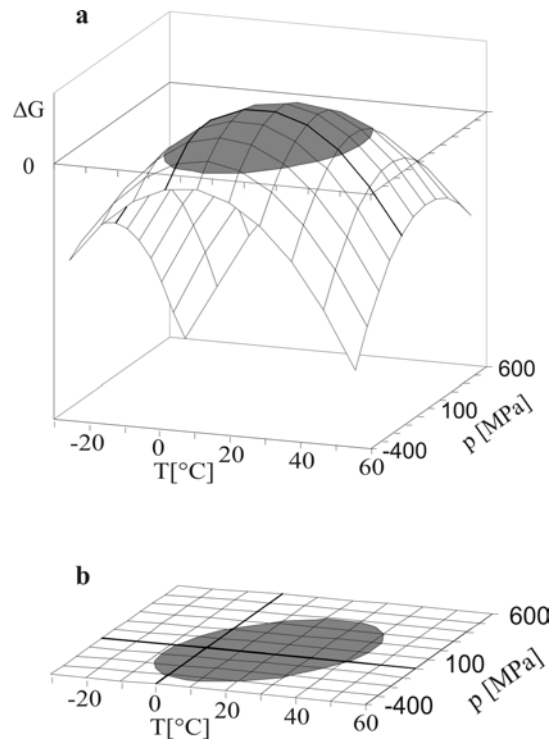
$$\Delta\alpha^2 > \Delta C_p \Delta\beta / T_0 \quad (38)$$

egyenlőtlenség fennállása esetén ellipszis.

A 90-es években egyre több fehérje fázisdiagramját határozták meg kísérletileg, sőt egyes fehérjék különböző mutánsai esetén is rendelkezésre állt a fázisdiagram. Ezért felmerült bennünk a kérdés, hogy az eltérő alakú és eltérő helyzetű fázisdiagramokból vissza lehet-e következtetni arra, hogy melyik termodinamikai paraméter változott (pl. a mutáció következtében), ill. hogy az elliptikus alaktól való eltérések hogyan magyarázhatók?

4.7.1.1. A másodrendű tagok hatása az elliptikus fázisdiagramra

Az első kérdést a legegyszerűbben a (37) egyenlet vizsgálatával közelíthetjük meg. A ΔG függvény másodfokú mind a $T-T_0$ mind pedig a $p-p_0$ függvényében. Az 56. ábra mutatja a ΔG -t a T és a p függvényében, illetve a $\Delta G=0$ kontúrt, ami az elliptikus fázisdiagram (v.ö. 6. ábra). Ebből kiindulva a $\Delta\beta$ ill. a $|\Delta C_p|$ növekedése az ellipszist „szélesíti” a p ill. a T tengelyek irányában. A ΔV_0 ill. a ΔS_0 növekedése eltolja az



56. ábra. a: A ΔG a hőmérséklet és a nyomás függvényében a Hawley által a kimotripszinogénre meghatározott adatokkal. b: a fenti görbe vetülete a p - T síkra. A szürke ellipszis jelenti azt a tartományt, ahol a natív állapot a stabilabb.

ellipszist a p ill. a T tengelyek irányában, és párhuzamosan növeli annak méretét is. A $\Delta\alpha$ paraméter pedig az ellipszis tengelyének irányát határozza meg.

A fenti heurisztikus analízisnél pontosabb eredményeket kapunk, ha az ellipszis egyenletéből kiszámítunk néhány paramétert, amelyek közvetlenül mérhetőek. Ha a T_0p_0 vonatkoztatási pontnak a szobahőmérsékletet és az atmoszferikus nyomást választjuk, akkor a szobahőmérsékleti denaturációs nyomás (p_t) ill. az atmoszferikus nyomáson mért hő- ill. hideg-denaturációs hőmérsékletek (T_t , T_c) értékei a következő egyenletekkel adhatók meg:

$$p_t = -\frac{\Delta V_0}{\Delta\beta} + \sqrt{\frac{\Delta V_0^2}{\Delta\beta^2} - 2\frac{\Delta G_0}{\Delta\beta}} + p_0 = \frac{\Delta V_0}{\Delta\beta} \left(-1 + \sqrt{1 - 2\frac{\Delta G_0\Delta\beta}{\Delta V_0^2}} \right) + p_0 \quad (39)$$

$$T_{t,c} = -\frac{\Delta S_0 T_0}{\Delta C_p} \pm \sqrt{\frac{\Delta S_0^2 T_0^2}{\Delta C_p^2} + 2\frac{\Delta G_0 T_0}{\Delta C_p}} + T_0 = \frac{\Delta S_0 T_0}{\Delta C_p} \left(-1 \pm \sqrt{1 + 2\frac{\Delta G_0 \Delta C_p}{T_0 \Delta S_0^2}} \right) + T_0 \quad (40)$$

ahol a pozitív előjel a hő- a negatív a hideg-denaturációra vonatkozik.

Ez alapján megkaphatjuk a különböző paramétereknek a denaturációs nyomásra ill. hőmérsékletekre gyakorolt hatását, amelyek a VIII. táblázatban vannak összefoglalva:

VIII. Táblázat.

A Hawley-egyenletben (37) szereplő paramétereknek a hő és nyomásdenaturációra gyakorolt hatása. (0: nincs hatás, +: növeli, -: csökkenti.)

Paraméter	A paraméter hatása		
	T_c -re (ha $\Delta S_0 < 0$)	T_t -re (ha $\Delta S_0 < 0$)	p_t -re (ha $\Delta V < 0$)
ΔV_0	0	0	-
$\Delta\beta$	0	0	-
ΔS_0	-	-	0
ΔC_p	+	-	0
$\Delta\alpha$	0	0	0
ΔG_0	-	+	+

A p - T diagramon ábrázolt fázisátalakulási görbe meredeksége $\left(\frac{dp}{dT}\right)_{\Delta G=0}$ a görbe bármely pontján a következőképpen számolható:

$$\frac{\partial p}{\partial T} = -\frac{\frac{\partial \Delta G}{\partial T}}{\frac{\partial \Delta G}{\partial p}} = \frac{\Delta S_0 - \Delta \alpha(p - p_0) + \Delta C_p \frac{T - T_0}{T_0}}{\Delta V_0 + \Delta \beta(p - p_0) + \Delta \alpha(T - T_0)} \quad (41)$$

A (41) egyenlet tulajdonképpen a jól ismert Clausius-Clapeyron egyenlet reciproka. Ezt a már ismertetett három denaturációs ponton (T_c, p_0 ; T_t, p_0 ; T_0, p_t) kiszámítva a

$$\left.\frac{\partial p}{\partial T}\right|_{T_c, p_0} = -\frac{\frac{\partial \Delta G}{\partial T}}{\frac{\partial \Delta G}{\partial p}} = \frac{\Delta S_0 + \Delta C_p \frac{(T_c - T_0)}{T_0}}{\Delta V_0 + \Delta \alpha(T_c - T_0)} \quad (42)$$

$$\left.\frac{\partial p}{\partial T}\right|_{T_t, p_0} = -\frac{\frac{\partial \Delta G}{\partial T}}{\frac{\partial \Delta G}{\partial p}} = \frac{\Delta S_0 + \Delta C_p \frac{(T_t - T_0)}{T_0}}{\Delta V_0 + \Delta \alpha(T_t - T_0)} \quad (43)$$

$$\left.\frac{\partial p}{\partial T}\right|_{T_0, p_t} = -\frac{\frac{\partial \Delta G}{\partial T}}{\frac{\partial \Delta G}{\partial p}} = \frac{\Delta S_0 - \Delta \alpha(p_t - p_0)}{\Delta V_0 + \Delta \beta(p_t - p_0)} \quad (42)$$

összefüggések adódnak.

Ezzel tulajdonképpen az eredeti kérdésünk fordítottjára adtunk választ: arra, hogy az egyes paraméterek hogyan változtatják meg a p_t , T_c , T_t denaturációs pontokat. Az inverz probléma megoldása csupán ezen három pont ismeretében nem lehetséges, hiszen a három denaturációs nyomás eltolódásából még nem tudunk visszakövetkeztetni a (37) egyenlet mind a hat paraméterének változására. Erre csak akkor van módunk, ha az elliptikus fázishatárt megmértük, és a (37) egyenlet segítségével a ΔV_0 , $\Delta \beta$, ΔS_0 , ΔC_p , $\Delta \alpha$, ΔG_0 paramétereket illesztjük. Egy másik alternatíva, ha meghatározzuk a három denaturációs pontot, és a denaturációs pontokban a görbe menetét (meredekségét), ekkor már hat paraméterünk van, amivel a kérdéses hat másik paraméter kiszámolható.

4.7.1.2. A harmadrendű tagok hatása az elliptikus fázisdiagram alakjára

A Hawley-elmélet egyik alapvető feltételezése az, hogy a ΔG sorfejtésében csak a másodrendű tagokat vesszük figyelembe, azaz a ΔG második deriváltjait a nyomástól és a hőmérséklettől függetlennek tekintjük. $\Delta\beta$, $\Delta\alpha$ ill. a ΔC_p állandósága az egész fázisdiagramon, természetesen megkérdőjelezhető, így a ΔG a következő alakban írható fel a harmadrendű tagok felhasználásával:

$$\begin{aligned} \Delta G = G_0 + \frac{\partial \Delta G}{\partial p} \Delta p + \frac{\partial \Delta G}{\partial T} \Delta T + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial p^2} \Delta p^2 + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \Delta G}{\partial T^2} \Delta T^2 + \frac{\partial \Delta G}{\partial p} \frac{\partial \Delta G}{\partial T} \Delta p \Delta T + \\ + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial p^3} \Delta p^3 + \frac{1}{2} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial p^2 \partial T} \Delta p^2 \Delta T + \frac{1}{2} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial T^2 \partial p} \Delta T^2 \Delta p + \frac{1}{6} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial T^3} \Delta T^3 + \dots \end{aligned} \quad (43)$$

ahol $\Delta p = p - p_0$, $\Delta T = T - T_0$. Az első hat tag már a (37) egyenletben is szerepelt, nevezzük ezek összegét ΔG_2 -nek, az alsó sorban szereplő együtthatókat pedig H_3 , H_2 , H_1 , H_0 -nak aszerint, hogy a p szerinti deriválás hányszor fordul elő benne. Így

$$\Delta G = \Delta G_2 + H_3 \Delta p^3 + H_2 \Delta p^2 \Delta T + H_1 \Delta p \Delta T^2 + H_0 \Delta T^3. \quad (44)$$

A H_3 , H_2 , H_1 , H_0 paraméterek tulajdonképpen a $\Delta\beta$, $\Delta\alpha$ ill. a ΔC_p deriváltjaival kapcsolatosak:

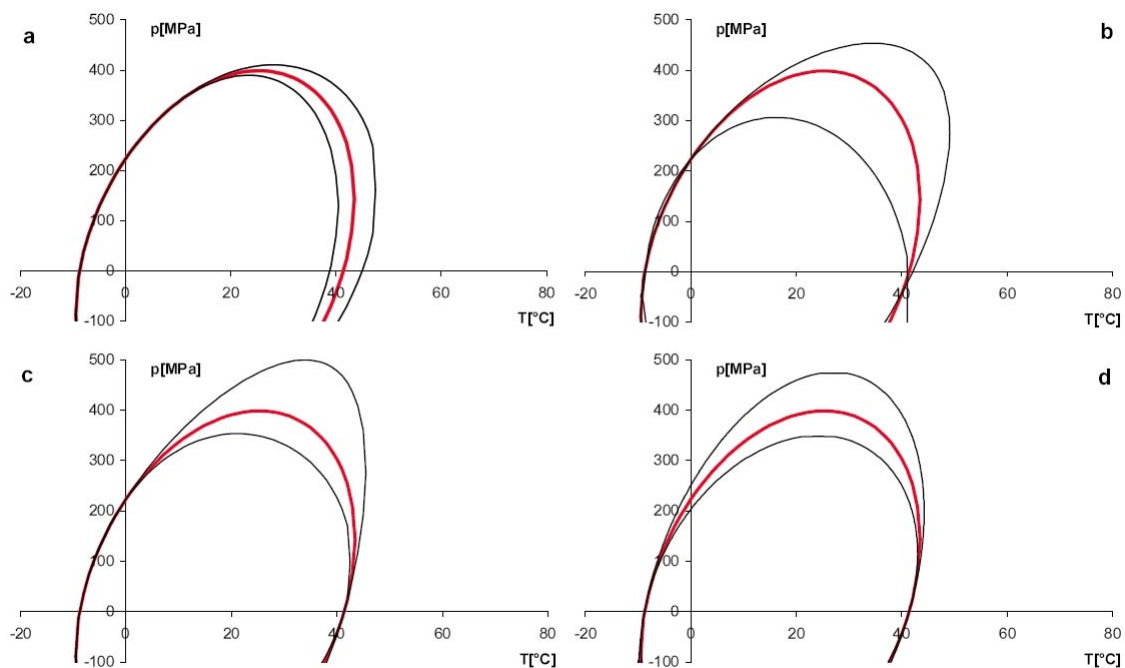
$$H_3 = \frac{1}{6} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial p^3} = \frac{1}{6} \frac{\partial \Delta \beta}{\partial p} \quad (45)$$

$$H_2 = \frac{1}{2} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial p^2 \partial T} = \frac{1}{2} \frac{\partial \Delta \beta}{\partial T} \Big|_p = \frac{1}{2} \frac{\partial \Delta \alpha}{\partial p} \Big|_T \quad (46)$$

$$H_1 = \frac{1}{2} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial p \partial T^2} = \frac{1}{2} \frac{\partial \Delta \alpha}{\partial T} \Big|_p = \frac{1}{2T_0} \frac{\partial \Delta C_p}{\partial p} \Big|_T \quad (47)$$

$$H_0 = \frac{1}{6} \frac{\partial^3 \Delta G}{\partial T^3} = \frac{1}{6} \left(\frac{\partial}{\partial T} \frac{\Delta C_p}{T} \right)_p \quad (48)$$

A (46) és (47) egyenletekben a Maxwell-relációval analóg harmadrendű összefüggések fedezhetők fel. Ha a H_0, \dots, H_3 tagokat nem hanyagolhatjuk el, akkor az elliptikus alak torzul. Az 57. ábra mutatja, hogyan változik az ellipszis a harmadrendű tagok figyelembevételével. Az ábrán az elliptikus fázisdiagram



57. ábra. Az elliptikus fázisdiagram alakjának torzulása a harmadrendű tagok figyelembevételével. A piros görbe a Hawley által a ribonukleázra illesztett ellipszis. A fekete görbék a harmadrendű tagok figyelembevételével kapott fázisdiagramok. A figyelembe vett harmadrendű tag értéke a: $H_0 = 0,061 \text{ J}/(\text{mol K}^3)$; b: $H_1 = 0,0132 \text{ J}/(\text{mol K}^2 \text{ MPa})$; c: $H_2 = 0,00148 \text{ J}/(\text{mol K MPa}^2)$; d: $H_3 = 0,000371 \text{ J}/(\text{mol MPa}^3)$. A belső görbék a harmadrendű tag negatív, a külsők a pozitív értékéhez tartoznak. Ezek az értékek a megfelelő másodrendű paraméterek megduplázódását okozzák 100°C ill. 500 MPa hatására.

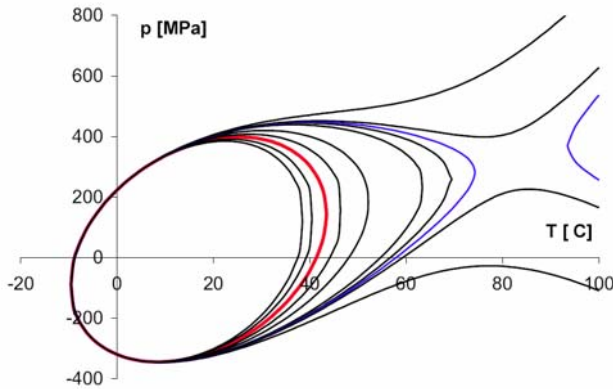
torzulásait látjuk a négy tag változása esetén. Eredeti fázisdiagramnak Hawley ribonukleázra illesztett fázisdiagramját vettük úgy, hogy az általa publikált ΔV_0 , $\Delta\beta$, ΔS_0 , ΔC_p , $\Delta\alpha$, ΔG_0 értékeket használtuk. Sajnos a harmadik deriváltak esetén nem álltak rendelkezésre kísérleti eredmények, ezért a harmadrendű tagok hatásának kísérleti összehasonlítása nehéz. Az ábrán a harmadrendű tagok hatására a ΔC_p ill. $\Delta\alpha$ 1%-ot változik 1°C -onként, ill. a $\Delta\beta$ 1%-ot változik 5 MPa -onként. Ez annak felel meg, hogy 100°C ill. 500 MPa hatására az adott értékek a duplájára nőnek, ill. 0-ra csökkennek. Hasonló mértékű változásokat lehet Ravindra és Winter (2003), valamint Dzwolak és mtsai (2003) ábráiról leolvasni a ΔC_p és $\Delta\alpha$, hőmérséklet-függését illetően. Mindegyik paraméter csökken a hőmérséklet növekedésével.

Természetesen elég nagy harmadrendű tagok az elliptikus formát szétrombolhatják. Ezt a H_0 esetében mutatom be. A harmadrendű tag figyelembevételével a

$$\Delta G = \Delta G_2 + H_0 T^3 = 0 \quad (49)$$

egyenlet T -ben harmadrendű, azaz bizonyos p értékek mellett három megoldása is lehet. Ez abban nyilvánul meg, hogy a p - T fázisdiagramon megjelenik (először az ellipszistől távol) egy a $T = \infty$ (vagy $T = -\infty$) felé nyitott tartomány, amely natív fázisú. Amíg ez távol van, nincs fizikai jelentősége, hiszen az a sorfejtés, amiből kiindultunk, csak a T_0 p_0 környezetében igaz. A H_0 növekedésével ez a tartomány közelebb jön az ellipszishez, és egy kritikus H_0 értéknél összefolynak. A problémát a nyomás-denaturáció oldaláról megközelítve azt látjuk, hogy a (49) egyenlet p -ben másodrendű, azaz egy adott hőmérsékleten mindig két nyomás-denaturációs pontot kapunk. (49)-nek a következő megoldásai vannak p -re:

$$p_{1,2} = - \frac{\Delta V_0 + \Delta \alpha T \mp \sqrt{(\Delta V_0 + \Delta \alpha T)^2 - 2\Delta \beta \left(H_0 T^3 - \frac{\Delta C_p}{2T_0} T^2 - \Delta S_0 T + \Delta G_0 \right)}}{\Delta \beta} + p_0 \quad (50)$$



58. ábra. Az elliptikus fázisdiagram „kinyílása” a H_0 paraméter növekedése esetén. A H_0 értékek belülről kifelé: -0,1; -0,05; 0 (piros görbe); 0,05; 0,1 ; 0,15; 0,16; 0,165 (kék görbe); 0,17; 0,2 J/(mol K³).

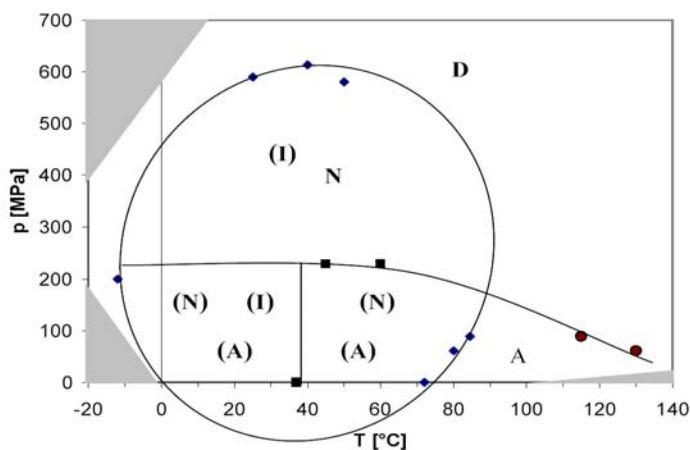
Ha a fázisdiagram ellipszise nem „nyílik ki” (ld. 58. ábra), akkor két olyan hőmérséklet van, ahol a p_1 és p_2 megoldások egybeesnek, azaz a gyök alatti kifejezés nulla. A gyök alatti kifejezés a T -ben harmadfokú. Ezt nullává téve harmadfokú egyenletet kapunk T -re. Ennek akkor van két valós megoldása, ha a determinánsa nulla (Korn és

Korn, 1975). Ez azonban H_0 -ban hatodfokú egyenletre vezet, azaz egyértelmű, hogy numerikus megoldásokra vagyunk utalva. A 58. ábra mutatja a fázisdiagram torzulását a H_0 függvényében. A Hawley által a ribonukleázra meghatározott elliptikus görbe a harmadrendű H_0 tag megjelenése esetén a $0,165 \text{ J/(mol K}^3) < H_0 < 0,17 \text{ J/(mol K}^3)$ tartományban „nyílik ki”. Ilyen típusú fázisdiagramot még

kísérletileg nem határozott meg senki, ebből arra lehet következtetni, hogy a harmadrendű tagok jelentősége nem éri el azt a kritikus szintet, ahol a fázisdiagram elliptikus jellege eltűnik.

4.7.2. Kibővített fázisdiagram a fehérje-fehérje kölcsönhatások figyelembevételével

Mint azt már említettük, a Hawley-féle leírás több egyszerűsítést is tartalmazott. A harmadrendű tagok elhanyagolása mellett a másik jelentős egyszerűsítés az volt, hogy a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat nem vette figyelembe. Azaz a Hawley-féle



59. ábra. A mioglobin kibővített fázisdiagramja, amely magában foglalja a fehérje-fehérje kölcsönhatás során létrejövő aggregációs fázist (A), valamint a feltekeredési intermediert (I) is. A zárójelbe tett betűk a metastabil állapotokat jelentik. A pontok a méréssel meghatározott átmeneti hőmérséklet ill. nyomásértékeket jelölik. A szürke tartomány a jég fázist jelöli (tiszta víz esetén). (N: natív, D: denaturált)

leírás csak egyetlen polipeptid láncra, ill. egy nagyon híg fehérjeoldatra vonatkozóan adhat helyes leírást. Azonban a biológiai rendszerekben a fehérjék legritkábban fordulnak elő híg oldatokban, (pl. a szemben a fehérjekoncentráció a több száz mg/ml-t is elérheti), ezért szerettük volna a fázisdiagramot ebbe az irányba is kiterjeszteni. Most nem elméleti számolásokra, hanem az infravörös spektroszkópai

méréseink által szerzett kísérleti eredményeinkre támaszkodunk. Az infravörös mérések kifejezetten alkalmasak a fehérje-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására, mert specifikus spektrális sávok mutatják az aggregációt, valamint a méréseknél eleve nagyobb fehérjekoncentrációra van szükség, mint például az abszorpciós vagy lumineszcens spektroszkópai eljárásoknál.

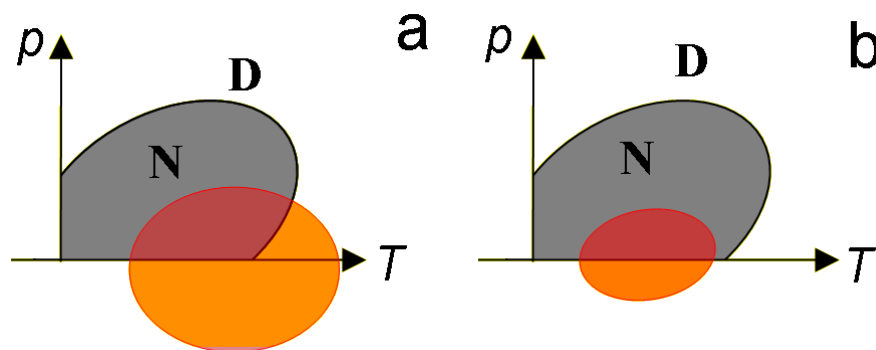
Már régen ismert volt, hogy a hődenaturált fehérjék nagy része megfelelően nagy koncentráció esetén aggregálódik. (Pontosabban elég nagy koncentráció esetén a kísérletileg ésszerűen elérhető időtartamon belül aggregálódik.) Az eddig említett saját eredmények (P7, P9, P10, P12, P20), valamint az irodalmi adatok (pl. Silva és mtsai, 2001) is azt mutatják, hogy a nyomás is befolyásolja a fehérjék aggregációját. A mioglobinton végzett méréseink alapján ezért egy új fázisdiagramot javasoltunk, mely az aggregált és intermedier fázisokat is magába foglalja. Ezt mutatja az 59. ábra.

A hődenaturált mioglobin a lehűtés után is megtartja aggregált formáját, ezért nyilvánvaló, hogy az új fázisdiagramon lennie kell metastabil fázisoknak is. Ezekben a nyomás-hőmérséklet tartományokban a fehérje két, vagy több állapotot is felvehet, amelyek közül az egyik csak lokális energiaminimum, a másik pedig globális minimum. A lokális minimumhoz tartozó metastabil fázisokat az 59. ábrán zárójelbe tett betűvel jelöltem. Az eddigi mérések alapján nem mindenhol lehet eldönteni, hogy melyik a globális minimum. Ezeknél a fázisoknál minden fázist zárójelbe tett betű jelöl, természetesen közülük az egyik (számunkra egyelőre ismeretlen) a termodinamikai értelemben stabil fázis.

Ezzel a fázisdiagrammal sikeresen megmagyarázhatók az eddigi mérések, amelyeket a mioglobinton végeztünk. A nyomás- ill. a hideg-denaturációt követő hőkezelés utáni aggregáció ugyanúgy, mint a szobahőmérsékletnél nagyobb nyomásokon végzett nyomás-denaturáció utáni aggregáció. A fázisdiagram ugyancsak tartalmazza a nagy nyomás okozta dezaggregáció jelenségét, amely mintegy 200 MPa felett észlelhető. Legújabb infravörös méréseinkkel felfedeztük, hogy a mioglobin esetén a hődenaturáció által okozott aggregációs tartomány felülről is korlátos, azaz a keletkezett aggregátumok megfelelően magas hőmérsékleten disszociálnak. A mioglobin hődenaturációját (infravörös spektroszkópiával) olyan alacsony nyomásértékeken mértük, amely már elég volt ahhoz, hogy a víz forrását a 100°C feletti mérésekben megakadályozza, de az aggregátumok disszociálásához önmagában még túl alacsony volt. Az aggregációs és disszociációs hőmérsékleteket 90 MPa-on $84,3 \pm 0,3$ °C-nak és $115,4 \pm 0,4$ °C-nak találtuk, 60 MPa-on ezek az értékek 80 ± 1 °C és 130 ± 1 °C voltak. Ezekből az adatokból a disszociációhoz rendelhető

térfogatváltozás negatívnak adódik, bár pontos értékét a nyomásmérés pontatlansága miatt nem lehetett kiszámítani. Ennek okai a (monomerek együttes hidrátburkához képest) lecsökkent hidrátburok, ill. az aggregátumokban (a nem elég szoros illeszkedés miatt) kialakuló üregek lehetnek. A magas hőmérsékleten disszociált fehérjeszerkezet infravörös spektruma alapján megerősítettük korábbi eredményünket arra vonatkozóan, hogy a nyomás- és hideg-denaturáció hasonló szerkezetet eredményez, míg a magas hőmérsékletű denaturált állapot ettől eltérő. Az 59. ábrán látható fázisdiagram már ezen mérések eredményeit is tartalmazza.

Ez utóbbi mérések adták az ötletet ahhoz a hipotézishez, hogy az aggregáció-dezaggregáció jelenségét is le lehetne írni egy, a Hewley-ével megegyező formalizmussal. A (37) egyenletben ugyanis semmi nem mutatja, hogy a két fázis (melyek termodinamikai paramétereinek különbségét a Δ szimbólum jelzi) fizikailag minek felel meg. Ebből a leírásból (amennyiben a paraméterek teljesítik a (38) egyenletet) az aggregált fázisra is egy hasonló ellipszist kapnánk, mint Hawley kapott a natív fázisra. A két ellipszis egymáshoz viszonyított elhelyezkedése határozná meg például, hogy a hődenaturált fehérje aggregálódik-e? Mint már említettem, vannak olyan fehérjék, pl. a ribonukleáz A és T, valamint a tormaperoxidáz, amelyek hődenaturált állapotban sem aggregálódnak. Ez a kettős elliptikus hipotézis leírná ezeket az eseteket is. A 60. ábra mutatja az ellipszisek lehetséges egymáshoz képesti elhelyezkedését a két esetben.



60. ábra. Az aggregáció és a natív (N) állapot hipotetikus elliptikus diagramjainak kölcsönös elhelyezkedése a fázisdiagramon. a) aggregálódó, b) nem aggregálódó hődenaturált fehérje esetén. A színes ellipszis mutatja azt a fázist, ahol az aggregált fehérje stabilabb, mint a denaturált (D), de nem stabilabb, mint a natív.

Összegezve: Kiterjesztettük a hagyományos Hawley-féle fázisdiagramot, egyrészt a harmadrendű tagok bevonásával, amelyek a fajhőnek, a kompresszibilitásnak és a hőtágulási együtthatónak, pontosabban ezek denaturált és natív állapotbeli különbségeinek a nyomástól és a hőmérséklettől való függését adják meg. Számolásaink alapján a fázisdiagram elliptikus alakja torzul, de az újonnan figyelembe vett paraméterek feltételezhető tartományában a fázishatár továbbra is egy konvex tartományt körülölelő görbe marad. Eredményeink egybeesnek azzal, hogy az irodalomban megjelent, ténylegesen lemért fázisdiagramok általában torzított ellipszisek voltak.

A mioglobinton végzett korábbi méréseinkre alapozva a fázisdiagramot olyan módon egészítettük ki, hogy a natív és denaturált állapotok mellett a félig felgombolyodott intermedier konformációkat is figyelembe vettük, valamint a korábbi méréseinkben megfigyelt ill. az irodalomban leírt aggregációs fázisokat is feltüntettük a diagramon. Legújabb infravörös méréseinkkel felfedeztük, hogy a mioglobin esetén a hődenaturáció által okozott aggregációs tartomány felülről is korlátos, azaz a keletkezett aggregátumok megfelelően magas hőmérsékleten disszociálnak. Ez alapján egy hipotetikus modellt dolgoztunk ki a hődenaturáció után nem aggregálódó fehérjék fázisdiagramjára.

4.8. Kis hő-sokk fehérjék oligomerizációjának és chaperon funkciójának kapcsolata. (T8, P16, P19)

Két kis hő-sokk fehérjét vizsgáltunk, a szemlencse fő fehérjekomponenseként is számon tartott α -krisztallint, valamint a *Methanococcus jannaschii* archeobaktériumból izolált MjHSP16,5-öt.

4.8.1. Az α -krisztallin chaperon aktivitásának nyomással történő indukálása

Az α -krisztallin a kis hő-sokk fehérjék családjába tartozik. Az egymáshoz hasonló A és B polipeptid láncok kb. 40 monomerből álló heterooligomereket alkotnak. Ismert volt, hogy az oligomer chaperon aktivitása növelhető kémiai denaturáns hozzáadásával, valamint a hőmérséklet emelésével (Raman és Rao, 1997, Datta és

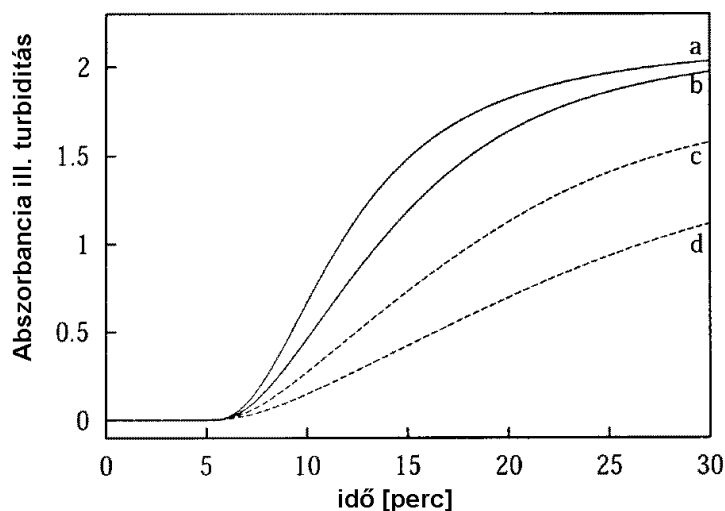
Rao, 1999). Mi a chaperon aktivitás növelésének új módszerét, a nyomás-aktivációt fedeztük fel és írtuk le. A nyomás-aktiváció tanulmányozása egyben a chaperon funkció szerkezeti alapjaihoz is új adalékkal szolgált.

Az α -krisztallin chaperon aktivitását a Farahbakhsh és mtsai (1995) által leírt módszerrel mértük. Ennek lényege az, hogy a két (A és B) polipeptid láncból álló inzulin diszulfid hídjait DTE-vel redukáltuk, majd az aggregációra hajlamos B láncok aggregációját

abszorpciós spektrofotométer (Cary E4) segítségével a 400 nm-nél mért fényszórás (pontosabban turbiditás) változásával követtük nyomon. Az aggregáció hatására turbiditás megnő, mivel a fényútból kiszórt fény hatása ugyanolyan, mintha az elnyelődött volna. (A turbiditás definíciója formailag megegyezik az abszorpciáéval: $\lg(I_0/I)$

ahol I_0 a beeső, I pedig az áteresztett fény intenzitása)

Az inzulin koncentrációja 0,5 mg/ml, az α -krisztalliné 0,6 mg/ml, amiből a móltömegek alapján 3:1 inzulin: α -krisztallin monomer arány adódik. A turbiditást az idő függvényében követve telítésbe menő görbéket kaptunk, amelyet $1-e^{-x}$ alakú függvénnyel jól lehetett illeszteni. A chaperon aktivitást a következőképpen definiáltuk:



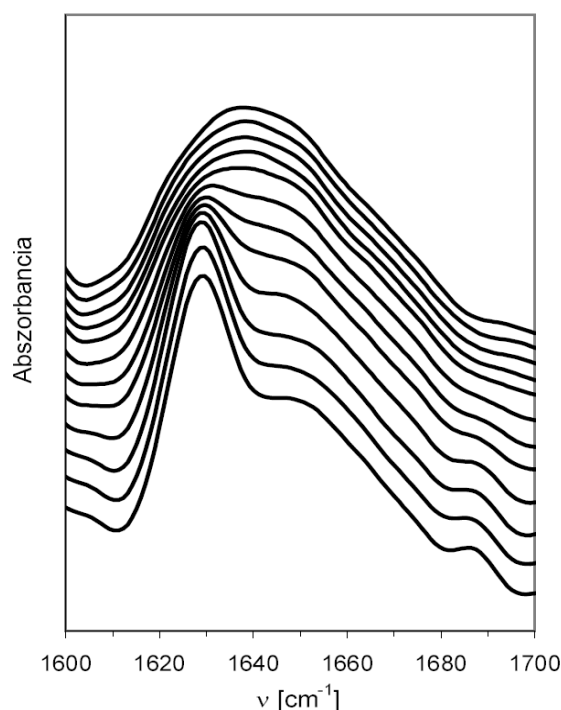
61. ábra. Az inzulin B láncok DTE-vel kiváltott aggregációjának mérése a turbiditás időfüggésének mérésével. α -krisztallin nélkül (a görbe), nyomáskezelés nélküli α -krisztallinnal (b), nyomáskezelt α -krisztallinnal rögtön a nyomáskezelés után (d) ill. a nyomáskezelés után 4 órával (c).

$$C_A = 1 - \frac{A_{\infty}}{A_{\infty, \text{contr}}} \quad (51)$$

IX. Táblázat.

Az α -krisztallin chaperon aktivitása különböző nyomásokon történt 20 perces kezelés után.

nyomás [MPa]	chaperon aktivitás
0 (kezelés nélkül)	$0,15 \pm 0,05$
100	$0,19 \pm 0,05$
200	$0,35 \pm 0,05$
300	$0,43 \pm 0,05$
340	$0,45 \pm 0,05$



62. ábra. Az α -krisztallin dekonvolvált infravörös spektrumának amid I sávja a nyomás függvényében. A spektrumok a jobb áttekinthetőség kedvéért függőlegesen el vannak tolva. A nyomás értékek alulról fölfelé: 0; 0,19; 0,24; 0,33; 0,41; 0,46; 0,55; 0,63; 0,66; 0,71; 0,74 és 0,78 GPa

exponenciálisan lecsengő görbével illeszthető.

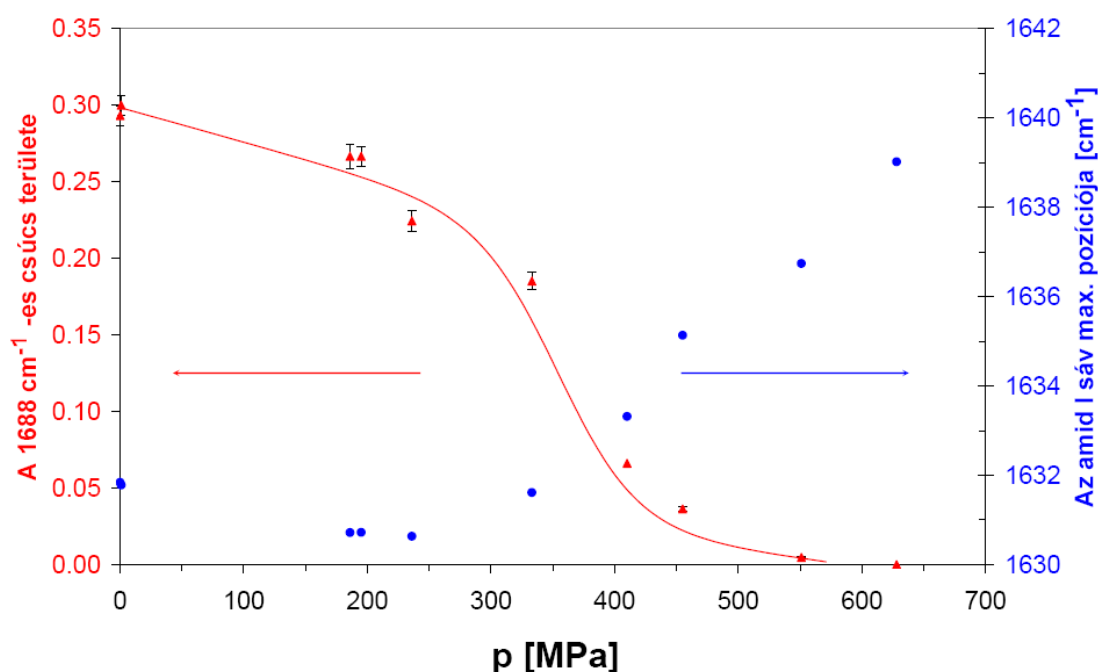
ahol A_{∞} a telítési turbiditás érték chaperon jelenlétében, míg $A_{\infty, \text{contr}}$ ugyanezen érték volt a chaperon nélkül végzett kontrol kísérletben.

A 61. ábra mutatja az aggregáció időfüggését chaperon nélkül, α -krisztallinnal, valamint nagy nyomáson aktivált α -krisztallinnal. A méréseket marhaszemből izolált α -krisztallinnal végeztük, 22°C-on pH7 50 mM BES pufferben. Az α -krisztallin nyomáskezelés nélkül ezen a hőmérsékleten csak nagyon mérsékelt védő hatással rendelkezik az aggregáció gátlását illetően, ahogy azt az *a* és *b* görbék összevetéséből is láthatjuk. Húsz perces, 300 MPa-on történő nyomáskezelés hatására a fehérje chaperon funkciója "aktiválódik". Ez az aktiváció csökken a nyomáskezelés után eltelt idővel. A csökkenés egy $\tau = 2,0 \pm 0,5$ óra időállandójú

Az aktiválódás mértéke függ az alkalmazott nyomástól. A vizsgált 0-340 MPa tartományban az indukált chaperon aktivitás növekszik, ahogy ez a IX. táblázatból is látszik.

A korábbi irodalmi adatok ellentmondásosak voltak a chaperon aktivitás és az oligomerméret közti összefüggést illetően. Ezért többfajta spektroszkópai vizsgálatot végeztünk a fehérje szerkezetének nagy nyomás alatti változásainak követésére, hogy ezeket a chaperon aktivitással korreláltathassuk.

Az FTIR méréseket a már említett gyémánt cellában végeztük. A fehérje koncentrációja itt az infravörös spektroszkópai technika sajátja miatt nagyobb volt (100 mg/ml), mint a turbiditás-mérések esetén, valamint itt a spektrális átfedés elkerülése végett TRIS puffert használtunk. A nyomás függvényében mért infravörös spektrumokat mutatja a 62. ábra. A spektrumot az 1629 cm^{-1} -nél elhelyezkedő komponens uralja, amely a β -szerkezethez rendelhető (ld. a II. táblázatot, és az ottani hivatkozásokat). A dekonvolváltság Gauss-függvényekkel való illesztése 35% β -szerkezetet, 36% rendezetlen és α -hélix szerkezetet, valamint 25% hajlatot és hurkot, ill. 3,5% intermolekuláris β -szerkezetet eredményezett. Ezek az



63. ábra. Az α -krisztallin 1688 cm^{-1} -nél jelentkező, az intermolekuláris kölcsönhatásokra utaló sávjának az intenzitása, valamint az amid I sáv maximum pozíciója a nyomás függvényében

értékek jó egyezésben vannak Farnsworth és mtsai (1998) CD vizsgálatainak eredményeivel, akik 17% α -hélixet, kb. 33% β -lemezt, és kb. 50% hajlatot és gombolyagot ("turns and coils") találtak. A mi méréseinkkel a rendezetlen struktúrában nem lehet elkülöníteni a kevés α -hélixet, de a β -lemezre adott becslések közel vannak egymáshoz.

Az intermolekuláris β -szerkezetre jellemző (tipikusan 1616 és 1685 cm^{-1} -nél elhelyezkedő) két oldalsávból most csak a magasabb hullámszámú komponens különíthető el, ami 1688 cm^{-1} -nél jelentkezik. Az alacsonyabb hullámszámnál jelentkező komponens, amelyik egyébként az intenzívebb szokott lenni, most beleolvad a spektrumot domináló 1629 cm^{-1} -es β -komponensbe. A szokásos 5:1 intenzitás (terület) arányt figyelembe véve, az intermolekuláris β -szerkezet 20%-ra becsülhető, ami 35 aminosavnak felel meg.

Az intermolekuláris β -szerkezetre jellemző 1688 cm^{-1} -es sáv intenzitása látszik a 63. ábrán. Ez a sáv a nyomás növelésével veszít intenzitásából és 450 MPa felett eltűnik. Az átmenet középpontja 370 MPa-nál van, az átmenet szélessége 140 MPa. A 63. ábrán az amid I sáv maximum pozíciója is ábrázolva van. Jól látható, hogy az amid I sáv pozíciója 300 MPa felett kezd el változni, és utána fokozatosan közelít a rendezetlen struktúrát jellemző 1640 cm^{-1} felé. Szó volt már arról, hogy a maximum pozíció nem a legmegfelelőbb paraméter a fehérje szerkezetváltozásának jellemzésére, mivel a komplex amid I spektrum maximumát a komponensek aránya nem lineáris függvény szerint határozza meg. Ezért elvégeztem a Gauss-függvényekkel történő illesztést 330 MPa-on is. A β -szerkezet 2%-os csökkenése és a rendezetlen szerkezet 4%-os növekedése következett be, az intermolekuláris β -szerkezet pedig a felére (3,5%-ról 1,8%-ra) csökkent az atmoszferikus nyomáson mérthez képest. Ezek a változások tehát az intermolekuláris β -szerkezet részleges felszakadásával magyarázhatók. Csak a teljesség kedvéért említem meg, hogy 700 MPa-on, amikor a fehérje denaturált állapotban van, illesztésünk 83% rendezetlen szerkezetet és ezen kívül még β -szerkezetet mutatott ki. Megállapíthatjuk tehát, hogy abban a nyomástartományban, ahol az α -krisztallin chaperon aktivitásának növekedése volt megfigyelhető, a fehérje másodlagos szerkezete nem változott, csak az intermolekuláris β -szerkezet változását sikerült detektálnunk. Ebből arra

következtettünk, hogy a monomerek szerkezete nem változik, hanem a monomerek oligomerré szerveződése, a negyedleges struktúra az, ami a nyomás hatására megváltozik, és ez a negyedleges szerkezetváltozás van kapcsolatban a chaperon aktivitás növekedésével.

Az oligomer legalábbis részleges szétesését támasztja alá az α -krisztallinon a nyomás függvényében végzett fényszórás mérésünk is. A szórt intenzitás mértéke a nyomás hatására felére csökkent, az illesztett szigmoid görbe középpontja 150 MPa-nál volt. Egy, a hidrofób felszínekhez kötő és kötött állapotban fluoreszkáló jelzőt, az ANS-t is felhasználtuk az oligomer fellazulásának mérésére. Az α -krisztallint tartalmazó ANS oldatban az ANS fluoreszcencia intenzitása 340 MPa-on ötször nagyobb volt, mint atmoszferikus nyomáson. (Az etanolban végzett kontrol kísérlet során ugyanez a nyomás csak 30%-os intenzitásnövekedést okozott.) Ez azt mutatja, hogy új hidrofób fehérjefelszínek váltak elérhetővé, ami megint csak a monomerek disszociációjára utal. Az említett hidrofób felszínek atmoszferikus nyomáson egymás felé fordulnak, az α -krisztallin ún. micella modellje szerint. A hatás nem teljesen reverzibilis, az ANS fluoreszcencia intenzitása a nyomáskezelés után atmoszferikus nyomásra visszatérve 30 %-kal nagyobb volt, mint a kezdeti. Ez, a nyomás után megmaradó többlet hidrofób felület hozható kapcsolatba a megnövekedett chaperon aktivitással. Ide tudnak ugyanis az aggregációra hajlamos fehérjék a saját hidrofób felületükkel kapcsolódni, ami meggátolja, hogy egymással alkossanak nagyméretű aggregátumokat.

A nagy nyomás által indukált aktivitásnövekedés mértékét a hőindukált aktivitásnövekedéssel összevetve azt látjuk, hogy a 300 MPa-on végzett kezelés hatása a 70°C-os hőkezelés hatásával egyezik meg (X. táblázat). Míg a hőmérséklet indukálta aktivitásnövekedés irreverzibilis (Burgio és mtsai, 2000), a nyomás hatására létrejött növekedés relaxálódott.

X. Táblázat.

Az α -krisztallin chaperon aktivitása különböző kezelések után közvetlenül.

kezelés	chaperon aktivitás
kezelés nélkül	0.15±0.05
20 perc 55 °C-on	0.21±0.05
20 perc 70 °C-on	0.47±0.05
20 perc 300 MPa	0.43±0.05

A nyomáskezelés után különböző spektroszkópai módszerekkel mért relaxációs időket összehasonlítva azt kapjuk, hogy a fényszórás, a triptofán és ANS közti energiatranszfer mértéke, valamint az infravörös spektrum változásai (másodlagos szerkezet és intermolekuláris kölcsönhatások felépülése) rövid relaxációs idejűek. A relaxációs idők ebben a csoportban ≤ 6 min értékűek voltak. A fényszórásnak volt egy másik komponense is, amely sokkal lassabban, 33 ± 4 h relaxációs idővel tért vissza a nyomáskezelés előtti állapotba. Ezt a következő módon magyaráztuk: a monomerek gyors reasszociálódása néhány perces időskálán történik. A monomereken belüli (a nyomás által elasztikusan perturbált) másodlagos szerkezet is gyorsan visszaalakul. Az egyensúlyi oligomerméret eléréséhez azonban sokkal hosszabb idő szükséges. Az általunk mért 33 órás relaxációs idő megfelel a Bova és mtsai (1997) által közölt alegység kicserélődési karakterisztikus időnek (32 h). Ez a monomereknek az oligomerek közti mozgásának karakterisztikus ideje.

Méréseinkkel bebizonyítottuk, hogy az eddigi feltételezésekkel ellentétben (Borgio és mtsai, 2000) a chaperon aktivitáshoz nincs szükség nagyméretű aggregátumokra, és az aggregátumméret növelésével nem növekszik a chaperon aktivitás.

Összefoglalva: A 100-340 MPa tartományban végzett nyomáskezelés hatására a kezelés után megnőtt a chaperon aktivitás, amit a DTE-vel (dithioerythritol) redukált inzulin aggregációjának gátlásával mértünk. Az aktivitásnövekedés 300 MPa –nál telítődött. A megnövekedett chaperon aktivitás $2,0 \pm 0,5$ h relaxációs idővel visszatért a nyomáskezelés előtti értékre. Az FTIR mérésekből megállapítottuk, hogy a nyomás növelésével először az α -krisztallin oligomer szerkezetéből adódó intermolekuláris kölcsönhatások tűnnek el fokozatosan. A monomerek denaturációja 300 MPa nyomás felett indul meg, és 700 MPa felett a fehérje teljesen széttekeredett állapotba kerül. Az oligomerméretnek 300 MPa alatti nyomás hatására történő csökkenését fényszórás méréssel is megerősítettük. Az ANS fluoreszcenciájának növekedése új hidrofób felületek megjelenését mutatta a 0-300 MPa nyomástartományban, ami az FTIR mérésekkel egybevetve szintén a monomerek közti kölcsönhatás csökkenéséből adódhat. Megállapítottuk, hogy a nagy nyomás az α -krisztallin negyedleges szerkezetének nagymértékű megváltozásához vezetett, ami a chaperon aktivitás időleges növekedését indukálta. A chaperon aktivitás párhuzamos

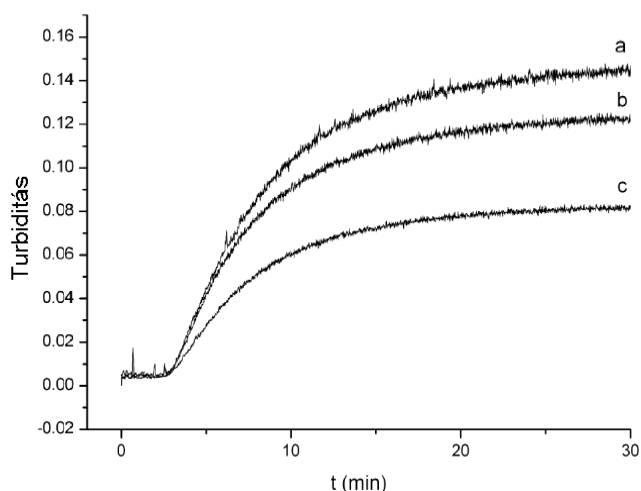
növekedéséből arra következtettünk, hogy az oligomer szerkezet fellazulása, részleges szétesése, és nem az oligomerméret növekedése szükséges az aggregációt gátló funkció teljesüléséhez.

4.8.2. A *Methanococcus jannaschii*-ből izolált hőtűrő kis hő-sokk fehérje (MjHSP16,5)

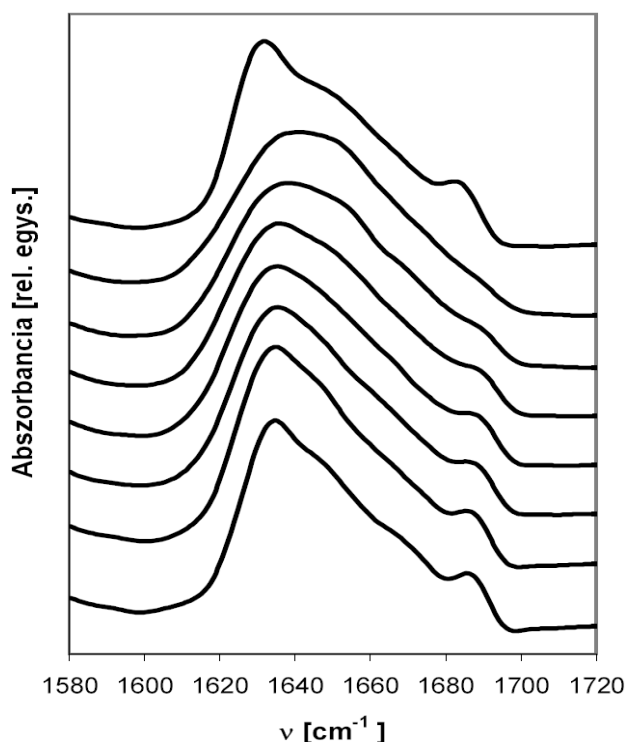
Az MjHSP16,5 fehérje a termofil archeabaktériumból származik, ezért chaperon aktivitással szobahőmérsékleten nem rendelkezik. A chaperon aktivitást itt a Das és mtsai (1995) által leírt módon, a rodanáz nevű fehérje aggregációjának segítségével határoztuk meg.

Az aggregációt 48°C-on történő inkubációval érték el. A rodanáz 0,5 mg/ml-es koncentrációban oldottuk fel a pH7,4 100mM TRIS

pufferben, a rodanáz:MjHSP16,5 monomer arány a kísérletekben 1:2 volt. A chaperon aktivitást ugyanúgy 400 nm-nél végzett turbiditásméréssel határoztuk meg, mint az α -krisztallin esetében. A 64. ábra mutatja a rodanáz aggregációját az idő függvényében chaperon nélkül, nyomáskezeletlen és nyomáskezelt MjHSP 16,5 jelenlétében 48°C-on. A 300 MPa-on végzett nyomáskezelés növelte a chaperon aktivitást, mint ahogy azt az α -krisztallinnál már tapasztaltuk. A chaperon aktivitás a 15 perces nyomáskezelés hatására 0,26-ról 0,72-re növekedett. Sajnos a nyomás függvényében végzett szisztematikus mérésorozathoz nem állt rendelkezésre elegendő minta, de a nyomásaktiválás így is bizonyítható volt.



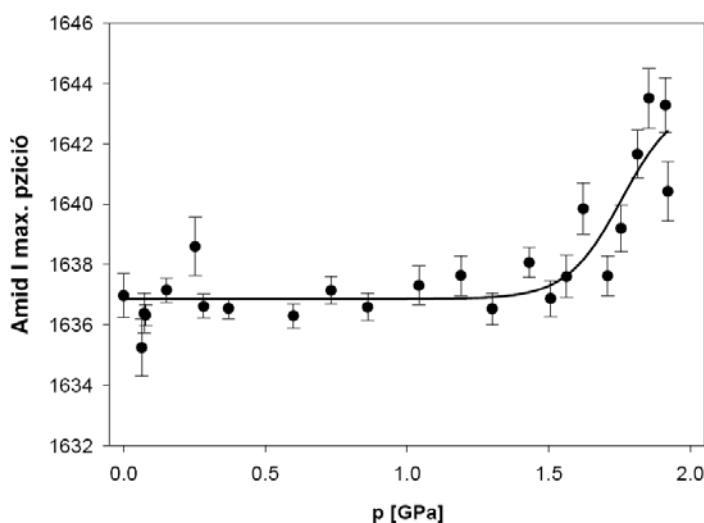
64. ábra. A rodanáz aggregációját jellemző turbiditás az idő függvényében a) chaperon nélkül b) nyomáskezeletlen MjHSP16,5 jelenlétében c) 300 MPa-on 15 percig nyomáskezelt MjHSP16,5 jelenlétében.



65. ábra. Az MjHSP16,5 dekonvolvált amid I sávja különböző nyomásokon. A spektrumok a jobb átláthatóság kedvéért függőlegesen el vannak tolva. A nyomásértékek alulról felfelé a következők: 0,0; 0,54; 1,04; 1,42; 1,64; 1,8; 1,9; 0,1 GPa.

Az FTIR mérések ebben az esetben is nagyobb koncentrációnál történtek, pD7 Tris-DCI pufferben. A 65. ábra mutatja az amid I sávot a különböző nyomásértékek esetén. A spektrumot a β -szerkezetre jellemző 1636 cm^{-1} -es komponens uralja. Ez összhangban van a röntgenkrisztallográfiával meghatározott másodlagos szerkezettel, ami szerint az aminosavak harmada alkot β -lemezes szerkezetet (Kim és mtsai, 1998a). A nyomáskísérletek során derült fény arra, hogy az MjHSP16,5 extrém

hőstabilitása extrém nyomásstabilitással is társul. 25°C -on a fehérjét nem sikerült nyomással denaturálni, mert $1,4\text{ GPa}$ -ig nem történt denaturáció, nagyobb nyomáson pedig az oldat megfagyott. Ezért a mérést 45°C -on megismételtük, ahol a (nehéz)víz fagyáspontja magasabb nyomásértéknél van. A 66. ábra mutatja a nyomásdenaturációt, az amid I sáv maximumán keresztül. Az ábrán levő görbét azzal a feltételezéssel illeszttem, hogy a szigmoid görbe maximumát a vizsgált nyomástartományban sikerült elérni. Az adatokból ez nem teljesen bizonyos, de figyelembe véve, hogy a denaturált fehérjék amid I sávjának maximuma az $1640\text{--}1645\text{ cm}^{-1}$ -es intervallumban van, ez a feltételezés jogosnak tűnik. Az illesztés alapján a denaturációs nyomás $1,76 \pm 0,12\text{ GPa}$ értéknél van. Ha elhagyjuk a fenti feltételezést, akkor ez az érték a denaturációs nyomásra adott alsó becslés lesz. Ismereteink szerint még nem találtak ilyen nagy nyomásstabilitású fehérjét, ez az



66. ábra. Az MjHSP amid I sávjának pozíciója a nyomás függvényében. A görbeillesztés részleteit ld. a szövegben.

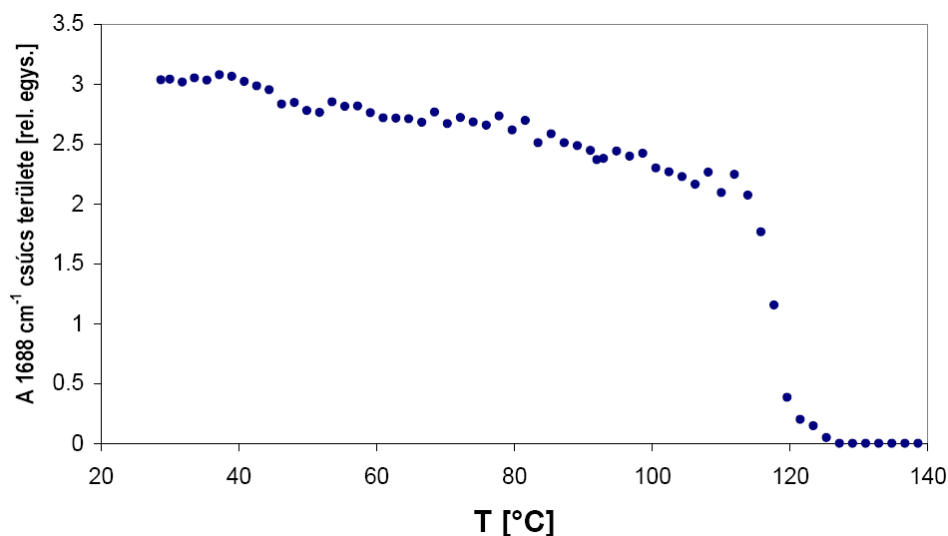
első alkalom, hogy egy termofil enzimről bizonyítást nyert, hogy nem csak a hő-, hanem a nyomásstabilitása is extrém mértékű.

A spektrumon jól megfigyelhető az 1688 cm^{-1} -nél jelentkező, az intermolekuláris kölcsönhatásokra utaló sáv is. A 66. ábrán látható, hogy a sáv intenzitása lassan

csökken a nyomás hatására, de csak közvetlenül a denaturációs nyomás alatt tűnik el. Az átmenet középpontja $1,70 \pm 0,01\text{ GPa}$ -nál van. Ez alacsonyabban van, mint a denaturáció, amiből arra következtethetünk, hogy a disszociáció közvetlenül a denaturáció előtt történik meg.

Vajon miért olyan erős az oligomerek közti kapcsolat? Miért nem történik meg a disszociáció alacsony nyomáson, mint ahogy az általában történni szokott? Erre a kérdésre a fényszórás mérések tárgyalása után adunk választ.

A nyomás függvényében végzett fényszórás vizsgálatok azt mutatták, hogy $0\text{--}400\text{ MPa}$ tartományban az MjHSP16,5 fényszórása a tizedére csökken, ellentétben az α -krisztallinnál tapasztaltakkal, ahol ez a csökkenés csak 50%-os volt. A fényszórás 22°C -on nem mutatott relaxációt, de 55°C -on már igen. A fényszórás eredmények arra engednek következtetni, hogy az oligomerek a nyomás hatására szétesnek. Mivel a szórt fény intenzitása (Rayleigh szórást feltételezve) első közelítésben arányos a részecskék méretével, a fényszórás csökkenésének mértékéből arra következtethetünk, hogy az oligomer monomerekre, vagy dimerekre bomlik. Azóta az oligomerméret csökkenését nagynyomású elektroforézissel is kimutattuk (Böde és mtsai, publikálatlan eredmény).



67. ábra. Az MjHSP16,5 amid I sávjában a 1688 cm⁻¹-es komponens területe a hőmérséklet függvényében.

Az eddigi adatok ellentmondásosnak tűnnek, hiszen a fényszórás szerint a disszociáció foka nagyobb, mint az α -krisztallinnál volt, az FTIR mérések viszont azt mutatják, hogy az intermolekuláris β -lemezes szerkezet jelentős része megmarad egészen magas nyomásokon is.

Az ellentmondást akkor tudjuk feloldani, ha alaposan szemügyre vesszük az MjHSP16,5 röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezetét. A monomerek egy 24 monomerből álló oligomert („24-mer”) alkotnak, de olyan módon, hogy a monomerek kettesével egymásba fonódnak, és a 24-mer tulajdonképpen 12 darab dimer alkotja. A dimerek β -szerkezetében egy-egy lánc a szomszédos monomerből származik. Ezáltal a dimerek erős intermolekuláris antiparallel β -lemezt alkotó hidrogénhidakkal vannak összekötve. Ez adja a 1688 cm⁻¹-nél mérhető sávot. Méréseink szerint, tehát a 24-mer nyomás hatására legvalószínűbben dimerekké disszociálnak, amelyek azonban csak közvetlenül a nyomás-denaturáció előtt esnek szét monomerekké. A megnövekedett chaperon aktivitás már a dimerekké történő disszociáció hatására bekövetkezik.

Érdemes megjegyezni az α -krisztallin és az MjHSP16,5 szerkezetében meglevő különbségeket. Az MjHSP16,5 monodiszperz oligomer populációt képez, azaz minden oligomer 24 alegységből épül fel, az α -krisztallin oligomerek nagysága

változó. Az α -krisztallin szerkezetében nem írtak le egymásba fonódó dimereket, ez valószínűleg csak az extrém termostabilitáshoz szükséges.

Végezetül megmértük még a fehérje hőstabilitását is, ugyanis hődenaturációt nem detektáltak még ezen a fehérjén. Arról volt ugyan adat, hogy még 110°C-on is van a fehérjének chaperon aktivitása (Kim és mtsai, 1998c), azonban a konkrét denaturációs hőmérséklet nem volt ismert. Méréseink szerint ez 117,4±0,4 °C-on történt meg (67. ábra). A mérést természetesen nagy nyomás alatt kellett végrehajtani, az átalakulási pontban a nyomás 230 MPa volt. A 1688 cm⁻¹-es komponenst követve annak eltűnése a denaturációval egyidejűleg következett be.

Összefoglalva: az α -krisztallinnál hatásosnak mutakozóhoz hasonló nyomáskezelés növelte az MjSHP16,5 chaperon aktivitását is, ami az oligomerméret csökkenésével is együtt járt. Az infravörös spektrum intermolekuláris antiparallel β -lemezekre jellemző sávja csak a denaturációs nyomáson tűnik el, ami azt mutatja, hogy ezek a kölcsönhatások a dimereken belül vannak, amelyek a 24 alegységből álló oligomer disszociációja során nem esnek szét. A fehérje nagy hőstabilitása ($T_{\text{denat}}=117$ °C) mellett extrém nyomásstabilitással is rendelkezett. A fehérje másodlagos szerkezete 45 °C-on 1,7 GPa nyomáson kezdett széttekeredni. A nyomásindukált chaperon aktivitás felfedezésén túl ezeket a hő- és nyomásstabilitási értékeket is mi állapítottuk meg először FTIR spektroszkópiával.

Ezekben a kísérletekben én az infravörös méréseket és kiértékelésüket végeztem, valamint én vezettem be a társszerzőket a nagy nyomású technikába.

4.9. A protoklorofillid fototranszformációjának és az azt követő Shibata-eltolódás aktivációs paramétereinek meghatározása. (T9, P14, P17)

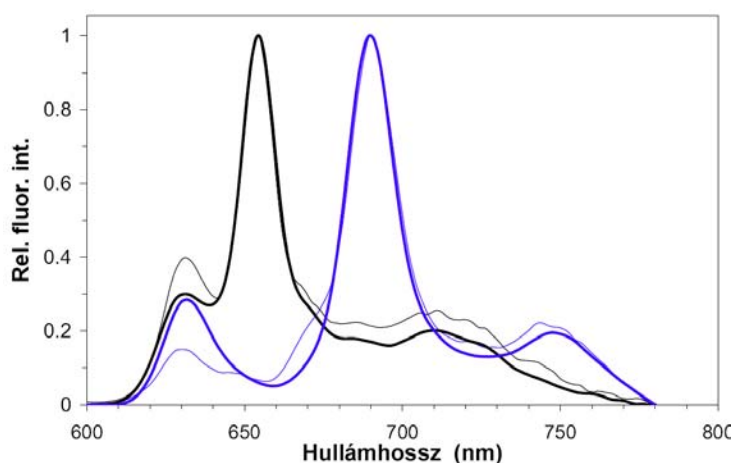
A növényi klorofillszintézis egyik meghatározó lépésének, a protoklorofillid fototranszformációjának, ill. a folyamatot követő molekuláris szerkezeti átrendeződésből adódó spektrális eltolódásnak a tanulmányozására azért különösen alkalmasak a sötétben nevelt (etiolált) növények, mert bennük a különböző pigmentformák fototranszformációja a megvilágítással szinkronizáltan indítható be és a spektrális változásaik is jól követhetők.

A protoklorofilid fény hatására bekövetkező klorofilidde alakulását (fototranszformációját) sötétben nevelt búzalevelekből izolált homogenátumon vizsgáltuk 0-0,4 GPa tartományban. A fototranszformáció során a protoklorofilid porfiringyűrűjében a 17. és 18. szénatomja közti kettős kötés telítődik (10. ábra). Ezt a folyamatot a prolamelláris test membránjának fő fehérjekomponensét adó NADPH:protoklorofilid oxidoreduktáz enzim (POR) katalizálja (Ryberg és Dehesh 1986). A folyamat spektroszkópiailag jól vizsgálható, ugyanis a szubsztrát és a termék fluoreszcencia emissziós maximuma között mintegy 40 nm-es különbség van, amely a reakció során a porfiringyűrű delokalizált elektronrendszerében bekövetkező jelentős változásnak köszönhető. A fototranszformációt követően a pigmentek disszociációjának és további szerkezeti átrendeződéseknek következtében a fluoreszcencia emissziós sáv mintegy 10 nm-es kék eltolódást szenved. Ép növényi levelek esetében ezt a jelenséget Shibata-eltolódásnak nevezik (Shibata, 1957). Munkánkban a fototranszformációt és a Shibata-eltolódást vizsgáltuk a nyomás függvényében, hogy felderíthessük azokat a termodinamikai paramétereket, amelyek csak nagy nyomással határozhatók meg (pl. aktivációs térfogat), és ezáltal a folyamatok molekuláris mechanizmusának megértéséhez további adalékot szolgáltatassunk.

A homogenátumot a sötétben nevelt búza levéldarabjainak izoláló pufferben (0.05 M pH 7,0 + 20 súly% szacharóz + 50 térfogat% glicerin) történő eldörzsölésével, majd több réteg gézen keresztül történő szűrésével nyertük. A 14 napos, etiolált búzalevelek csúcsától kb. 1,5 cm-re kezdődő, 5 cm-es darabot használtuk fel (Ryberg és Sundqvist 1982a, 1982b).

4.9.1 Az etiolált búzalevél homogenátum és az intakt levél összehasonlítása

Először is azt mutatjuk be, hogy az általunk használt homogenátumban ugyanúgy végbemegy a vizsgálni kívánt reakció, mint az intakt levelekben. A 68. ábra mutatja a sötétben nevelt búzalevelek és a belőlük készített homogenátum fluoreszcencia spektrumait 77 K-en megvilágítás előtt és villanófénnyel (Chinon 900 C vakuval) történt megvilágítás után. A fototranszformáció nem megy végbe 77 K-en a méréshez használt gerjesztő fény hatására, így a megvilágítatlan minták fluoreszcens vizsgálata ezen a hőmérsékleten lehetséges. A 655 nm-nél jelentkező emissziós vonal a megvilágítás hatására eltűnik mind a levél, mind pedig a homogenátum esetén,



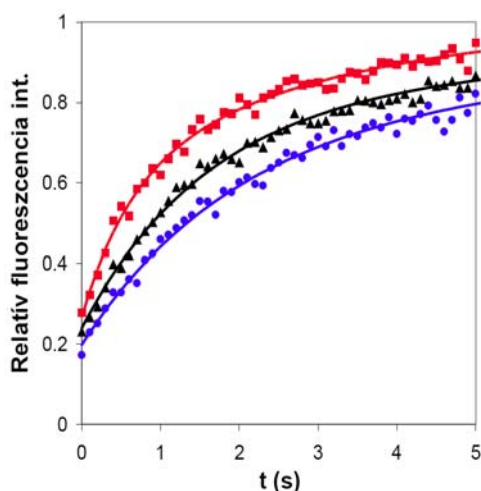
68. ábra. Sötétben nevelt búzalevél ill. a belőle készült homogenátum fluoreszcencia emissziós spektrumai megvilágítás előtt ill. villanófénnyel való megvilágítás után, 77 K-en. A fekete vonalak a megvilágítás előtti, a kék a megvilágított mintákhoz tartoznak. A vékony vonal a levél, a vastag a homogenátum spektruma.

mivel ez az ún. fotoaktív, enzimhez kötött protoklorofillid emissziós vonala (Böddi és Frank, 1997). A 690 nm-es sáv viszont a keletkezett klorofillidre jellemző (Böddi és Frank, 1997), ami abból is látszik, hogy csak a megvilágított mintákban van jelen. Ennek a sávnak a változása is teljesen párhuzamosan

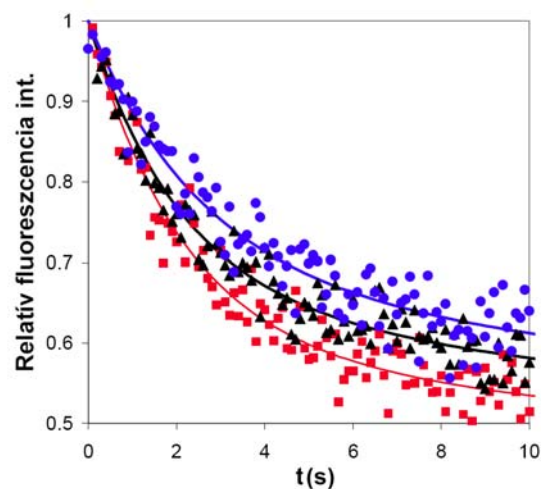
zajlik le a levél és a homogenátum esetén. A fentiek alapján kijelenthetjük, hogy a sötétben nevelt búzalevélből izolált homogenátum alkalmas a fototranszformáció vizsgálatára, benne a fototranszformáció szempontjából fontos protoklorofillid-POR-NADPH membránhoz kapcsolt komplexek működőképes formában maradtak meg. A homogenátum készítéssel kiküszöbölhető az egyes levelek közötti biológiai eltérésekből, valamint a levél fényszórásából, geometriájából adódó mérési hiba.

4.9.2. A protoklorofillid foto-transzformációjának vizsgálata

A fototranszformáció kinetikájának nyomástól való függését úgy vizsgáltuk, hogy a sötétben nagy nyomás alá helyezett homogenátumot a spektrofluoriméter (FS9000CD, Edinburgh Instruments) 440 nm-es gerjesztő fényével megvilágítva indukáltuk az átalakulást. A kísérleteket 20°C-on végeztük. Ismeretes, hogy az etiolált homogenátumban a szubsztrát az ún. protoklorofillid-POR-NADPH makrokomplexek belsejében viszonylag nagy feleslegben áll rendelkezésre (Böddi és mtsai (1983) szerint tíz protoklorofillid is juthat egy enzim molekulára), a megvilágítással a foto-transzformációhoz szükséges fény is folyamatosan biztosított, és a NADPH mennyisége is elegendő, a reakció sebesség-meghatározó lépése tehát a szubsztrátnak az enzimhez való kötődése, esetleg a NADPH enzimhez való kötődése.



69. ábra. Etiolált búza homogenátum fluoreszcencia intenzitása 690 nm-nél a megvilágítási idő függvényében három nyomáson: ■ 0,1 MPa, ▲ 200 MPa, ● 400 MPa. (Az intenzitások a 30-60 s-os időintervallumban mért intenzitás átlagára vannak normálva.) Az illesztett görbék ugyanolyan színnel jelöltek, mint a mérési adatok.



70. ábra. Etiolált búza homogenátum fluoreszcencia intenzitása 655 nm-nél a megvilágítási idő függvényében három nyomáson: ■ 0,1 MPa, ▲ 200 MPa, ● 400 MPa. (A kezdőértékre normált görbék.) Az illesztett görbék ugyanolyan színnel jelöltek, mint a mérési adatok.

A klorofillid emissziójára jellemző 690 nm-es hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitást mutatja a 69. ábra. A görbék a megvilágítás kezdetétől számított 30 és 60 s között mért intenzitás átlagára vannak normálva.

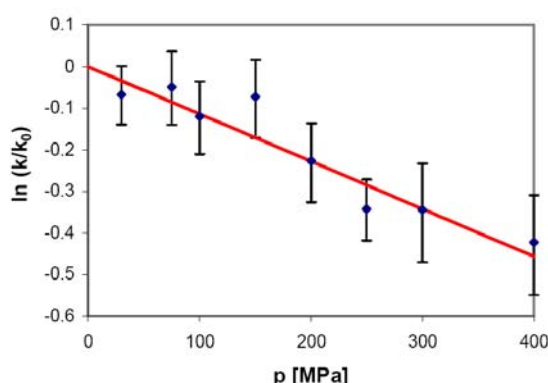
Az intenzitásadatokat egyetlen exponenciális tartalmazó telítésbe menő függvénnyel nem lehetett kielégítően illeszteni, fel kellett tételezni, hogy a folyamat két exponenciális segítségével írható fel:

$$I_{690}(t) = 1 - a_1 e^{-t/\tau_1} - a_2 e^{-t/\tau_2} . \quad (52)$$

A folyamatot a másik oldalról, a protoklorofillid fogyásának szempontjából is vizsgáltuk. A 655 nm-nél mért fluoreszcencia intenzitás időbeli csökkenését mutatja a 70. ábra. A folyamatra szintén kettős exponenciális lehetett illeszteni:

$$I_{655}(t) = a_3 e^{-t/\tau_3} + a_4 e^{-t/\tau_4} + b . \quad (53)$$

A 69. és 70. ábrából látható, hogy a fototranszformáció a nyomás hatására lelassul. Ez azt mutatja, hogy olyan folyamatról van szó, amelynek aktivációs térfogata



71. ábra. Az I_{690} -re illesztett nagyobb sebességi állandó (k_1) logaritmusának nyomástól való függése az illesztett egyenessel.

pozitív, azaz a folyamat során az aktivált komplex térfogata nagyobb, mint a kiindulási állapotban. Azonban a 400 MPa nyomás sem volt képes megakadályozni a reakciót, ami azt mutatja, hogy a POR enzim nem denaturálódik ezen a nyomáson.

Az illesztésben használt τ időállandó reciproka a sebességi állandó. Az

I_{690} -re illesztett komponensek közül a gyorsabb lefutású exponenciális függvényre jellemző sebességi állandó logaritmusának a nyomástól való függését mutatja a 71. ábra. A (14) egyenlet szerint a sebességi állandó logaritmus arányos az aktivációs térfogattal. Az így kiszámított

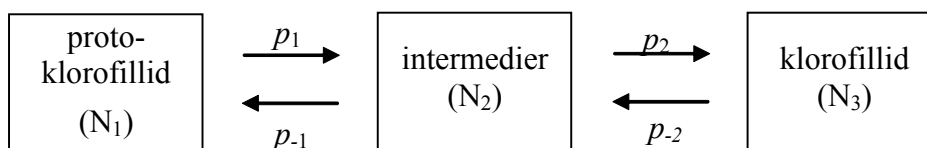
XI. Táblázat.

Az etiolált búzából készült homogenátumon mért 690 és 655 nm-es fluoreszcencia emissziós sávok intenzitásának a megvilágítás hatására történő változásából számolt paraméterek: a nulla nyomásra extrapolált sebességi állandók ($k_{i,0}$) és a folyamatokhoz tartozó aktivációs térfogatok ($\Delta V_i^\#$).

	690 nm-es sáv		655 nm-es sáv	
i	1	2	3	4
$k_{i,0} \text{ [s}^{-1}\text{]}$	0.83 ± 0.05	0.13 ± 0.02	0.56 ± 0.03	0.082 ± 0.004
$\Delta V_i^\# \text{ [cm}^3\text{/mol]}$	$2,8 \pm 0,5$	$1,8 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0.5$

aktivációs térfogatok a XI. táblázat tartalmazza.

Hogyan értelmezhetjük ezt a kettős exponenciálissal leírható folyamatot? A legegyszerűbb elképzelés szerint egy három kompartmentes modellt állíthatunk fel:

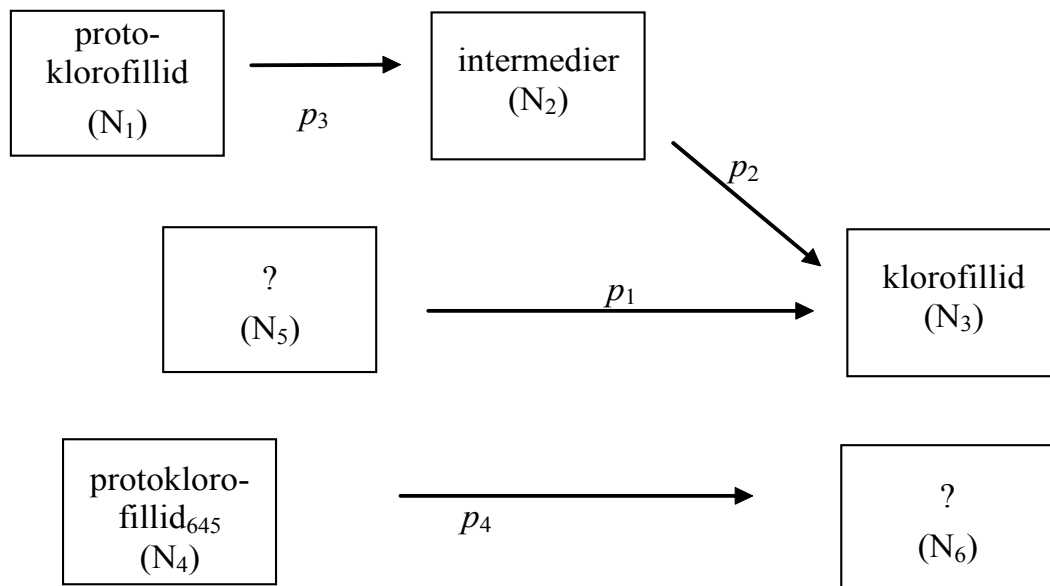


Az átmeneti valószínűségeket p_1 , p_{-1} , p_2 , p_{-2} jelöli. Eredményeink azonban nem illeszkednek ehhez a modellhez. Ugyanis a fenti modell differenciálegyenleteinek megoldásait az

$$\begin{aligned} N_1 &= N_1^{(0)} + N_{1,0}^{(1)} e^{\lambda_1 t} + N_{1,0}^{(2)} e^{\lambda_2 t} \\ N_2 &= N_2^{(0)} + N_{2,0}^{(1)} e^{\lambda_1 t} + N_{2,0}^{(2)} e^{\lambda_2 t} \\ N_3 &= N_3^{(0)} + N_{3,0}^{(1)} e^{\lambda_1 t} + N_{3,0}^{(2)} e^{\lambda_2 t} \end{aligned} \quad (54)$$

alakban lehet felírni. (A λ_1 és λ_2 a differenciálegyenlet mátrixának sajátértékei, az $N_{j,0}^{(i)}$ együtthatók pedig a mátrix sajátvektoraiból ill. a kezdeti feltételekből számolhatók. A sajátértékek negatívak, és így az exponenciális tagok csökkenő függvények. A harmadik sajátérték nulla, ez adja az $N_1^{(0)}$ tagot) Az (54) egyenletekből látszik, hogy – amennyiben az N_1 és az N_2 is két exponenciális függvény összegével írható le (azaz $N_{1,0}^{(1)}$, $N_{1,0}^{(2)}$, $N_{3,0}^{(1)}$, $N_{3,0}^{(2)}$ egyike sem nulla) – mind a kiindulási anyag, mint pedig a termék keletkezésére ugyanolyan sebességgel lecsengő exponenciálisok adódnak. Esetünkben azonban ez nem így történt, ahogy az a XI. táblázatból is kitűnik.

Ezért egy több kompartmentes hipotetikus modellt alkottuk meg, figyelembe véve azt is, hogy a visszafelé irányuló folyamatok sebességi állandói elhanyagolhatók, hiszen a reakció a szakirodalom és a kísérleteink alapján is irreverzibilisnek tűnik. Ez a modell a következő:



Ennek a modellnek az a hátránya, hogy nyitott, ugyanis a p_4 átmeneti valószínűséggel jelzett folyamat végállapota a feltételezések szerint nem fluoreszkál, így méréseinkkel nem detektálható. Ugyancsak nyitott a modell a p_1 folyamat felől. Azonban a modell egybeesik számos irodalmi adattal, ezért ésszerű hipotézisnek tűnik, annak ellenére, hogy megerősítésére természetesen még további kísérletek szükségesek.

Ezen hipotetikus modellünk megoldása az N_1 -re egy egyszerű exponenciális, míg általános esetben N_3 -at három exponenciális függvény segítségével írja le:

$$N_3 = n - n \frac{p_3 e^{-p_2 t} - p_2 e^{p_3 t}}{p_3 - p_2} + m(1 - e^{-p_1 t}) , \quad (55)$$

ahol n és m az N_1 ill. N_5 kezdőértékei, a többi N_i nulláról indult. Az a tény, hogy kísérleteinkben csak két komponens sikerült elválasztani, két módon magyarázható. Ha az egyik átmeneti valószínűség sokkal nagyobb, mint a másik, akkor az ezzel szorzott exponenciális tag nagyon kis amplitúdója miatt nem mutatható ki a kísérleti adatokban. Hasonlóan, ha a két exponenciális kitevője közel azonos, akkor ezen komponensek szétválasztása egy rosszul kondicionált matematikai feladat. A modell megoldása szerint az N_1 csökkenése egyetlen exponenciális függvény szerint megy végbe, így itt még egy párhuzamos folyamatot is feltételezni kell, amely ugyanennél a hullámhossznál emittáló, de kissé eltérő (vagy eltérő környezetben lévő) protoklorofillid pigment formák átalakulásához tartozik. Csak így magyarázható a 655 nm-es fluoreszcencia intenzitás kettős exponenciális lecsengése.

Modellünket alátámasztják azok a vizsgálatok is, amelyek szerint a másik fotoaktív protoklorofillid forma (az ún. P_{klid645}) párhuzamos átalakulása (Klockare és Virgin 1983, Böddi és mtsai, 1991) is lezajlik az etiolált minta megvilágítása során, azonban ennek a folyamatnak a kinetikája az általunk detektált 655-nm-en emittáló formához képest eltérő lehet. Ennek a folyamatnak az eredményeként olyan klorofillid termék keletkezik, amelynek fluoreszcencia emissziós sávja átlapol az általunk mért pigment emissziójával. Továbbá számos kísérleti eredmény mutat abba az irányba, hogy a folyamat során nem fluoreszkáló intermedierek, ill. fluoreszcencia kioltók is keletkeznek, amelyek megmagyarázzák az eltérő 655 és 690 nm-es kinetikákat.

(Litvin és Belyaeva 1971, Mathis és Sauer 1973, Dujardin és Correia 1979, Dobek és mtsai, 1981, Belyaeva és mtsai, 2001, Heyes és mtsai, 2002).

A modellben a sebességi állandók hozzárendelése úgy történt, hogy az azonos aktivációs térfogatú folyamatokat rendeltük egymáshoz (azaz a $p_2=k_2$ és $p_3=k_3$ átmeneti valószínűségekkel ill. sebességi állandókkal jelzetteket). Az intermedierek létezésére kísérleteinkben az utal, hogy a k_2 és k_3 sebességi állandók különbözőek. Illik a modellbe az is, hogy a második lépés sebességi állandója (k_2) kisebb, mint az első lépésé (k_3).

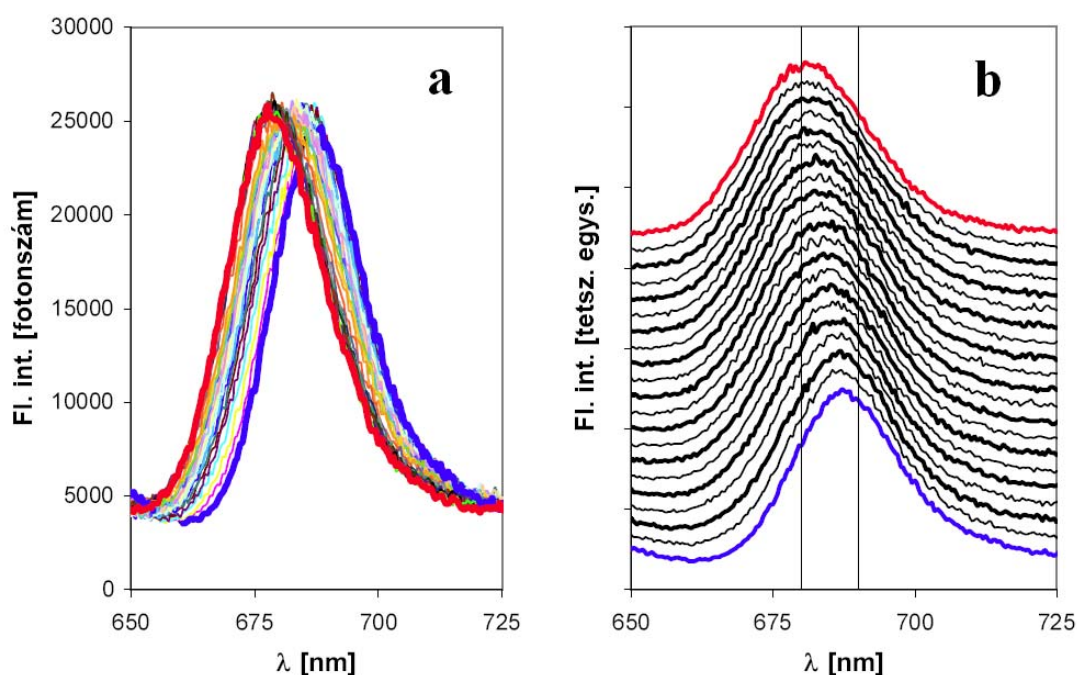
Mind a k_2 mind pedig a k_3 sebességi állandójú folyamatnak az aktivációs térfogata $1,7 \text{ cm}^3/\text{mol}$ körül van. Ez megfelel egy hidrogénhíd kötés létrejöttéhez szükséges térfogatnak (Heremans, 1982, van Eldik és mtsai, 1989, Michels és mtsai, 1996). Természetesen nem gondoljuk, hogy hidrogén híd épülne ki, hiszen a fototranszformációkor telítődő kötés mindkét oldalán szénatom található. Azonban a hidrogénnek az egyik molekuláról a másikra való átkerülése a hidrogénhídhoz hasonló térfogatú átmeneti állapoton keresztül valósulhat meg. Egy másik lehetőség szerint a protoklorofillidnek az enzimhez való kötődése egy hidrogénhíd kötéssel valósul meg (Van der Cammen és Goedheer 1984).

Összegezve: megállapítottuk, hogy a protoklorofillid klorofilliddé való átalakulása a teljes nyomástartományban végbement, tehát az enzim nem denaturálódik 400 MPa alatt. Megállapítottuk továbbá, hogy a POR enzim kinetikája nyomástól függő. A kinetika a nagy nyomás hatására lassul, ami az jelenti, hogy az aktivált állapot térfogata nagyobb, mint a kiindulási állapoté. A kinetikát analizálva két komponenst találtunk mind a klorofillid keletkezését, mind pedig a protoklorofillid mennyiségének csökkenését mérve. Meghatároztuk a folyamatokhoz tartozó aktivációs térfogatokat.

Megállapítottuk, hogy a protoklorofillid átalakulása során legalább két párhuzamos folyamat megy végbe, melyek során nem fluoreszkáló közbülső termékek is megjelennek. Az átalakulás aktivációs térfogata a hidrogén-kötés kialakulásához szükséges térfogat nagyságrendjébe esik.

4.9.3. A Shibata-eltolódás vizsgálata

A fototranszformáció után megjelent, 690 nm-nél jelentkező fluoreszcencia emissziós sáv az idővel fokozatosan eltolódik kb. 680 nm-re. Ezt a kék eltolódást (Shibata eltolódás) is a sötétben nevelt búzalevelekből készített homogenátumon vizsgáltuk a nyomás függvényében.



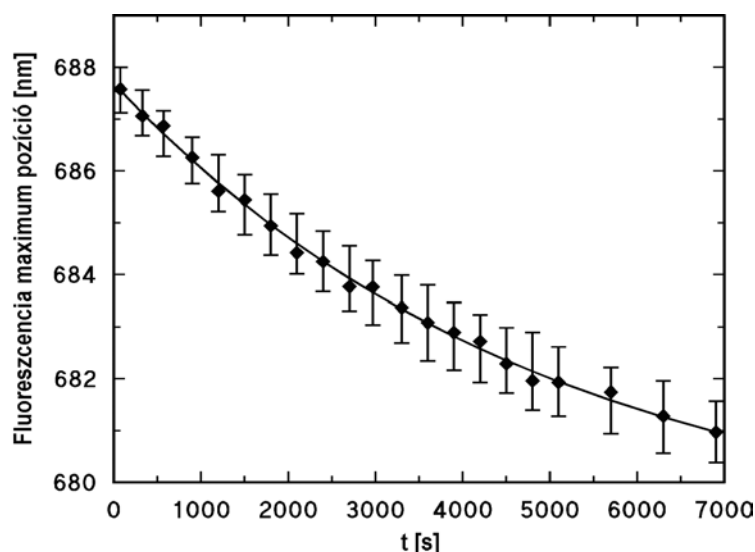
72. ábra. Etiolált búzalevél-homogenátum Shibata eltolódása 20°C-on, 75 MPa-on. a: Eredeti spektrumok, a kék vastag spektrum a legelső, a piros vastag pedig a legutolsó spektrum. b: Ugyanazok a spektrumok függőleges eltolással. A spektrumok felvételének kezdetei (lentről felfelé) : $t = 1,25; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80; 85; 95; 105$ és 115 min ($t = 0$ a megvilágítás kezdete). A 680 és 690 nm-nél húzott segédvonalak az eltolódás bemutatását szolgálják.

Az előző szakaszban leírt fototranszformáció-mérés után (amely a megvilágítás első 60 másodpercében tökéletesen végbement) az 580 és 730 nm közötti tartományban mértük az emissziós spektrumokat. Az első spektrumot a megvilágítás kezdetétől mért 70-100 másodpercen belül indítottuk, majd 5 percenként mértünk. A fototranszformációt követő Shibata-eltolódást mutatja a 72. ábra. A 72. a ábrán látható, hogy nincs olyan hullámhossz, ahol a fluoreszcencia intenzitás ne változna,

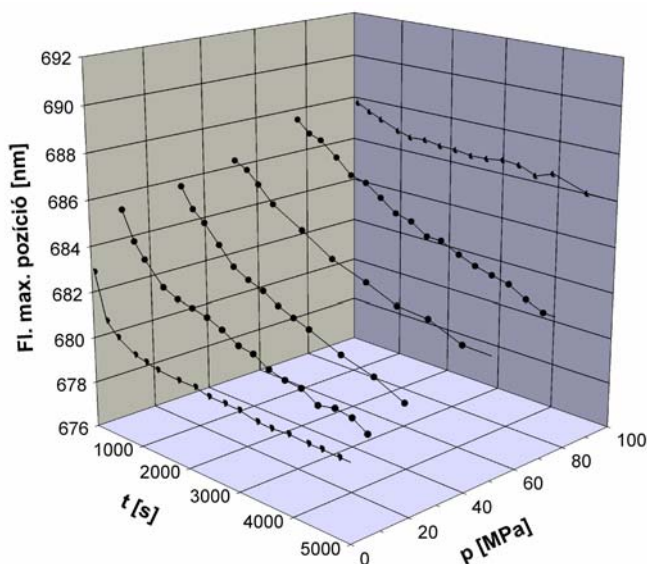
azaz a spektrumoknak nincs izoszbesztikus pontja. Ebből az következik, hogy az átalakulás nem úgy történik, hogy az egyik spektrális komponens csökken, a másik pedig növekszik. Valószínűleg az átalakulás során a kromofór környezete

folytonosan változik, és ezért a kromofór gerjesztési energiája (ill. az emissziós spektrum pozíciója) folytonosan tolódik el. Ezért a spektrum maximum pozícióját használhatjuk a folyamat jellemzésére. Az eltolódás exponenciális jellegű, a maximum pozíció jól illeszthető exponenciális függvénnyel (ld. 73. ábra). Az eltolódás

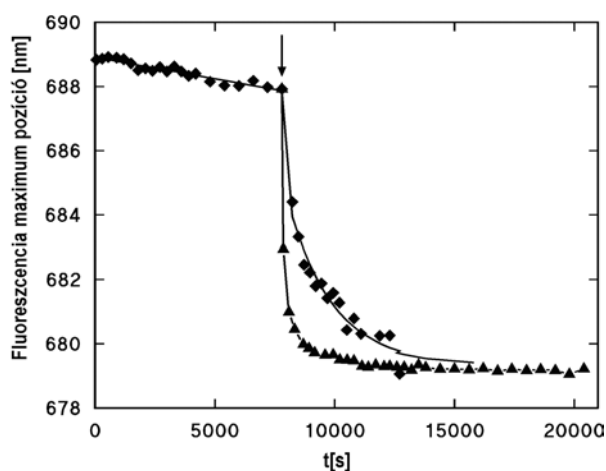
nyomás hatására lassult, illetve a folyamat végállapota is megváltozott.. Ezt mutatja a 74. ábra. A Shibata-eltolódást 20°C-on 100 MPa nyomás már gyakorlatilag teljesen gátolta, a mérés két órás időtartama alatt sem volt jelentős eltolódás. (A mérés idejét limitálta a minták degradációja, ezért általában nem mértünk ennél hosszabb ideig.) Az eltolódás gátlása



73. ábra. A búza homogenátum megvilágítás után kialakuló 690 nm-es emissziós sávjának eltolódása (Shibata eltolódás) az idő függvényében 75 MPa-on.



74. ábra. A búza homogenátum megvilágítás után kialakuló 690 nm-es emissziós sávjának eltolódása különböző nyomásokon. (A pontokat összekötő vonalak csak a szemléltetést szolgálják.)

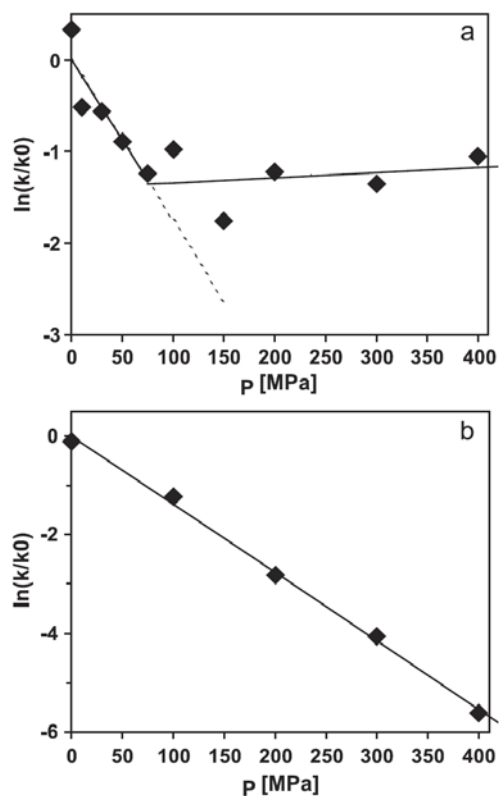


75. ábra. A 200 MPa-on megvilágított búza homogenátum Shibata-eltolódása 200 MPa-on, valamint a nyomás 5 MPa-ra csökkentése után (♦). Összehasonlításképp az atmoszferikus nyomáson megvilágított minta Shibata-eltolódását is ábrázoltuk (▲). A nyíl a nyomás csökkentésének, ill. atmoszferikus nyomáson a megvilágítás kezdetének az idejét mutatja. ($T=20^{\circ}\text{C}$)

azonban nem járt a szerkezet irreverzibilis változásával. Ugyanis amikor a több mint két órás 200 MPa-os kezelés után a nyomást

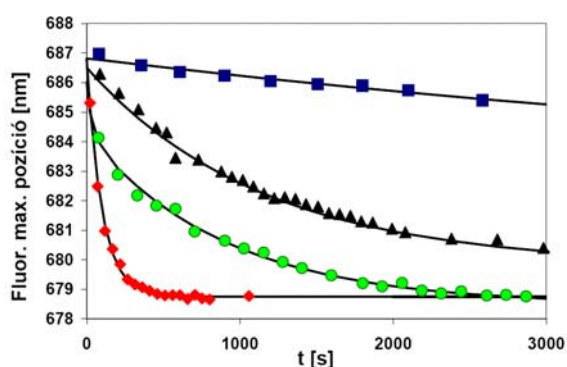
az atmoszferikus nyomás közelébe* csökkentettük, a Shibata eltolódás végbement (ld. 75. ábra). A folyamat karakterisztikus ideje ekkor azonban négyszer nagyobb volt, mint a nyomáskezelés nélkül megvilágított mintában de a végállapot azonos volt.

A folyamat kinetikájának nyomásfüggését nem csak 20°C -on, hanem 30°C és 40°C -on is mértük. Ennél nagyobb hőmérsékleten a homogenátum már nem volt stabil, (Mysliwa-Kurdziel és mtsai, 1999). Magasabb hőmérsékleteken nagyobb nyomás kellett az eltolódás gátlásához (30°C -on 300 MPa, 40°C -on 500 MPa). Az eltolódásra illesztett exponenciális függvények kinetikus állandóit az előző fejezetben már tárgyaltak szerint ábrázoltuk féllogaritmikus grafikonon (76. ábra). A 76. a ábrán látható törés azt mutatja, hogy két módon mehet végbe a Shibata-



76. ábra. A búza homogenátum Shibata-eltolódásának a nyomástól való függése, a: 20°C -on, valamint b: 40°C -on.

* Technikai okokból nem az atmoszferikus nyomás értékére, hanem 5 MPa-ra csökkentettük a nyomást.



77. ábra. Búza homogenátum Shibata-eltolódása atmoszferikus nyomáson. A görbékhez tartozó hőmérsékletek: ■ 10°C, ▲ 20°C, ● 30°C, ◆ 40°C.

XII. Táblázat.

A búza homogenátum Shibata eltolódásának kinetikáját jellemző aktivációs térfogatok.

T[°C]	$\Delta V^\#$ [cm ³ /mol]
20	43 ± 1 ¹
20	-1 ± 4 ²
30	39 ± 3
40	$35 \pm 1,5$

¹ 0-100 MPa, ² 100-400 MPa

eltolódás. Az egyik folyamat, amelyik alacsony nyomásokon dominál, a nyomás növekedésével lassuló folyamat, azaz pozitív aktivációs térfogattal jellemezhető. Az aktivációs térfogatot az előző alfejezetben említett

$$\Delta V^\# = \frac{\partial \ln k}{\partial p} \quad (56)$$

egyenlet segítségével, a 76. ábra pontjaira illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg. Azokon a nyomásokon, ahol az eltolódás gyakorlatilag gátolt volt, (pl. 20°C-on 100 MPa fölött) a pontokra közel vízszintes egyenest lehetett illeszteni, ami azt jelenti, hogy a nagy nyomástartományban nagyon lassan végbemenő folyamat nem igényel térfogatváltozás az aktivációs állapoton való áthaladás során. A meghatározott aktivációs térfogatokat a XII. táblázat foglalja össze.

A Shibata-eltolódás kinetikáját atmoszferikus nyomáson a hőmérséklet függvényében mérve a 77. ábrán látható görbéket kaptuk. Az illesztett exponenciális függvények kinetikai együtthatóiból az Arrhenius-ábrázolás, ill. az ismert

$$\Delta E^\# = -R \frac{\partial \ln k}{\partial (1/T)} \quad (57)$$

összefüggés segítségével a 100 ± 20 kJ/mol értéket kaptuk.

Eredményeink értelmezését megnehezítette, hogy - a Shibata-eltolódással kapcsolatban az irodalomban található számos kísérleti munka ellenére - az eltolódás mögött levő molekuláris mechanizmust még nem tisztázták egyértelműen. Ismert

volt, hogy a megvilágítás után a klorofillid-POR-NADPH komplexek aggregált állapotban vannak (Böddi és mtsai, 1990). A klorofillszintézis következő lépése az észterezés, amit a klorofill-szintetáz enzim végez, ehhez azonban monomer klorofillid szükséges. Ez arra utal, hogy a kromofórok disszociációja a folyamat egyik fontos lépése lehet (Butler és mtsai, 1966, Ogawa és Konishi, 1980). Az irodalomban azonban a Shibata-eltolódásért mind a klorofillid észterezését (Sironval és mtsai, 1965), mind a rendezett membránstruktúra szétesését (Artus és mtsai, 1992, Solymosi és mtsai, 2006), mind a POR makrokomplexek disszociációját (Ryberg és Dehesh, 1986), mind pedig a POR enzim konformációs változását (Wiktorsson és mtsai, 1993) felelőssé tevő munkák is megjelentek.

A nagy nyomásnak a membránokra való hatását illetően számos mérés ismert az irodalomban, de ezek nagy részét ún. modellmembránokon végezték, amelyek egy vagy néhány komponensből állnak. Ezek a membránok a hőmérséklet függvényében egy jól definiált hőmérsékleten fázisátalakulást mutatnak, amikor a szénhidrogén láncok „megolvadnak” (azaz bennük a *gauche* konformerek felszaporodnak) (Winter és mtsai, 1993). Ezt gél-folyadékkristály átmenetnek is nevezik. Az átalakulási hőmérséklet a lipidek szénhidrogénláncának hosszától, telítettségétől és a fejcsoport típusától függően változik. Az átalakulási hőmérséklet nagy nyomás hatására eltolódik: az egykomponensű modellmembránoknál ez tipikusan 0,2°C/MPa, azonban telítetlen zsírsavláncok esetén ez az érték 0,1°C/MPa alatti is lehet (Heremans, 1982, Winter és mtsai, 1996). Adott hőmérsékleten a nyomást emelve a rendszer a folyadékkristály fázisból a gél fázisba megy át, azaz merevebbé válik. Azonban a komplex lipid rendszerek ennél lényegesen bonyolultabb *p-T* fázisdiagramot mutathatnak (Winter és mtsai, 1996). A Shibata eltolódás gátlását jelentő nyomásértékeket a hőmérséklet függvényében ábrázolva a meredekségre 20 MPa/°C értéket kapunk. Ha ezt a gátlást a lipidek fázisátalakulásával akarjuk magyarázni, akkor a fázisátalakulási hőmérsékletnek 0,05°C/MPa nagyságú eltolódást kellene mutatnia. Ez feleakkora, mint az egykomponensű telítetlen lipidmembránokon mért irodalmi érték. Tekintetbe véve, hogy a rendszerünk túlnyomó részt (87-96%-ban) többszörösen telítetlen (18:3) lipideket tartalmaz, továbbá sem a lánc hossz, sem pedig a fejcsoport tekintetében nem mondható homogénnek (Selstam és Sandelius, 1984), az általunk mért érték elfogadható. Ezen

felül meg kell még említeni, hogy a legtöbb modellmembrán mérés lamelláris szerkezetű lipid kettősrégeken történt, míg esetünkben a POR enzim és a hozzá kötött kromofór egy bonyolultabb membránstruktúrában helyezkedik el. Ez az ún. „prolamelláris test”, amelyben a lipidek ún. köbös fázisban vannak. Ez egy nagy görbülettel rendelkező komplex „csőrendszer”, amelyben a fázisátalakulás érzékenyebb lehet a nyomás változására. Megemlítendő még, hogy – bár egészen más rendszeren, de – a mi méréseinkkel analóg eredményről tudósított Scarlata (1996) is, aki egyes membránenzimek működésében a fázisátalakulási nyomáson és hőmérsékleten ugrásszerű változást írt le. Ugyancsak fontos, hogy a lipid fázisátalakulások reverzibilisek, ami megint egybeesik a megfigyelésünkkel, hogy a nyomásgátolt eltolódás a nyomás megszüntetése után végbemegy (75. ábra). Arra következtetünk tehát, hogy a Shibata-eltolódás nagy nyomás általi gátlása elsősorban a lipid fázis fluiditásának csökkenése útján történik. A membránstruktúra fluiditása tehát mindenképpen közvetett vagy közvetlen módon szerepet kell hogy játsszon a Shibata-eltolódás mögötti folyamatokban.

A Shibata-eltolódás aktivációs térfogatai jelentősen kisebbek, mint a fehérje nagy konformációs változásaihoz tartozó térfogatok. Ezért kizárható a POR enzim denaturációja, de disszociációja is, mert azokhoz nagyobb térfogat tartozik (Heremans 1982). Sajnos a membránfolyamatok aktivációs térfogatairól nem áll rendelkezésre irodalmi érték, így ezekkel nem lehet összehasonlítást tenni.

A Shibata-eltolódás gátlásáról mondtak alapján a folyamatban a lipidrétegnek fontos szerepe van, ezért feltehető, hogy az aktivációs térfogat egy része is ezzel kapcsolatos. Továbbá feltehető, hogy az aktivációs térfogat kisebb fehérje konformációs változásokat is magában foglal. Az aktivációs energia viszont arra utal, hogy a folyamat során a kovalens kötés energiatartományába eső mértékű változás történhet. Ez a POR fehérje foszforilációs vagy defoszforilációs reakcióihoz rendelhető (Wiktorsson és mtsai, 1996).

Részben a klorofillid molekulák disszociációja is magyarázhatja a kapott aktivációs értékeket. Az aktivációs térfogatok annak feleltethetők meg, mint ha két párhuzamosan elhelyezkedő porfirinmolekula közti távolság kb. 0,35 nm-el megnövekedne. Természetesen, ha a porfirinek eltávolodnak egymástól a köztük

levő térfogatot a víz betölti, így a disszociáció csak részben magyarázhatja az aktivációs térfogatot.

Megfigyelhetjük még, hogy az aktivációs térfogat a hőmérséklet növelésével egyre csökken. Ezt úgy lehet értelmezni, hogy a lipidrétegnek a hőmérséklettel való fellazulása megnövelte a kiinduló állapot térfogatát, ami végül is az aktivációs térfogat csökkenéséhez vezetett.

Összefoglalva: A fototranszformációt követő kék eltolódást exponenciális függvényekkel lehetett leírni. A kinetika nyomástól függő szakaszából a Shibata-eltolódás mögötti biológiai folyamat aktivációs térfogatára 20, 30 és 40 °C-on rendre 43 ± 11 , 39 ± 3 és $35 \pm 1,5$ cm³/mol-nak adódott. Az aktivációs térfogat kevesebb, mint a fehérjék szétgombolyodásához szükséges térfogatváltozás. Ennek egyik lehetséges értelmezéseként a porfirinek dezaggregációját valószínűsítettük, amely az enzim konformáció-változásával együtt mehet végbe.

Az $\ln(k/k_0)$ – nyomás görbe töréspontja a hőmérséklet növelésével egyre jobban tolodott a nagy nyomások felé: míg 20 °C-on csak 100 MPa, 40 °C-on már 400 MPa fölött volt. Tehát az a pont, ahol a Shibata-eltolódás gyakorlatilag megáll, a lipidek fázisátalakulási hőmérsékletének nyomástól való függésével analóg módon változott. A 10-40 °C hőmérséklettartományban atmoszferikus nyomáson végzett mérésekből az aktivációs energiára 100 ± 20 kJ/mol adódott.

Mivel a Shibata-eltolódás még két órás 500 MPa-os kezelés után is teljes mértékben végbement a nyomás megszüntetésekor, arra következtettünk, hogy a nyomás nem okozott irreverzibilis változásokat a rendszerben.

4.10. Módszer kifejlesztése a fehérjék FTIR spektrumának analizálásához szükséges Fourier öndeconvolúció optimális paramétereinek meghatározására. (T10, P2)

A spektrális felbontás növelésére, az átlapoló spektrális komponensek vonalszélességének csökkentésére és ezáltal az átlapoló komponensek szétválasztására általánosan elterjedt a Kauppinen féle Fourier öndeconvolúciós módszer. Ez azonban számos műterméket generálhat, amennyiben nem megfelelően

választják meg a számolásban használt paramétereket. A keletkező műtermékek egyik fő oka az, hogy a Fourier térben végzett dekonvolúció során a jelben meglevő fehérzaj a magasabb frekvenciatartományban fokozottan felerősödik. Kauppinen ezért apodizációs függvényt alkalmazott, amivel részben rontotta a módszer hatékonyságát, részben pedig új paramétereket és új műtermékek esélyét vezette be.

Olyan módszert dolgoztam ki, amellyel a Fourier öndekonvolúció optimális paraméterei egyértelműen meghatározhatók.

A Fourier öndekonvolúció (röviden dekonvolúció) matematikailag azon alapul, hogy a mért spektrum a spektrális vonalak pozícióját (ν_i) meghatározó Dirac-delták

összegének ($D(\nu) = \sum_{i=1}^n C_i \delta(\nu - \nu_i)$) és egy vonalalak függvénynek ($L(\nu)$) a konvolúciójaként áll elő:

$$S(\nu) = L(\nu) \otimes D(\nu) . \quad (58)$$

Ekkor a vonalalak függvény ismeretében a Fourier térben elvégzett osztással a vonalalak „leválasztható”, azaz elvileg visszakaphatjuk a $D(\nu)$ függvényt, azaz a spektrális komponensek végtelenül vékonyak lesznek:

$$D(\nu) = F^{-1} \left(\frac{F(S(\nu))}{F(L(\nu))} \right) , \quad (59)$$

ahol $F()$ a Fourier transzformációt, $F^{-1}()$ pedig az inverz Fourier transzformációt jelöli. Ilyen mértékű vonalkeskenyítést azonban gyakorlatban nem lehet elérni, egyrészt ugyanis az $L(\nu)$ függvény sem tökéletesen ismert, másrészt pedig a spektrumban mindig jelen levő zaj miatt. A következőkben a zaj hatását fogom elemezni, és feltételezem, hogy a vonalalak függvény ismert.

A valódi spektrum $S'(\nu) = L(\nu) \otimes D(\nu) + N(\nu)$ alakba írható, ahol az $N(\nu)$ a mérés során fellépő zaj. Tekintsük ezt fehérzajnak, amelynek a spektrális eloszlása egyenletes.

Ekkor a Fourier térbeli osztás elvégzése után a kapott $D'(\nu)$ függvény a Fourier transzformáció linearitása miatt a következő formába írható:

$$D'(\nu) = F^{-1}\left(\frac{F(S'(\nu))}{F(L(\nu))}\right) = D(\nu) + F^{-1}\left(\frac{F(N(\nu))}{F(L(\nu))}\right) \quad (60)$$

Látjuk, hogy a második tag tartalmazza a zaj által okozott spektrumtorzulást. Gyors kvalitatív analízissel megállapíthatjuk, hogy a dekonvolúció a „nagyfrekvenciás” zajt erősíti fel. Az $F(N(\nu))$ függvény ugyanis a fehérzaj definíciója szerint konstans várható értékű, míg a vonalak függvény Fourier transzformáltja csökkenő tendenciát mutat. Ezzel osztva, az $F(N(\nu))$ -t, olyan függvényt kapunk, amely növekszik. Ennek az inverz transzformáltja a hullámszám függvényében gyorsan változó komponenseket erőteljesen tartalmazó „nagyfrekvenciás” zaj.

A 78. ábra mutatja a dekonvolúció menetét a spektrum doménben és a spektrum Fourier transzformált terében (amit Fourier doménnek fogok nevezni). Az infravörös spektroszkópiában a spektrum független változója a (cm^{-1} -ben mért) hullámszám, ennek Fourier transzformáltja az interferogram[†], amit az FTIR technikában a mozgó tükör elmozdulása, illetve az ezáltal létrejött útkülönbség, a retardáció függvényében mérnek. Ezért a további tárgyalásban a spektrum domén független változójaként a hullámszámot, a Fourier domén független változójaként pedig a retardációt alkalmazom. A matematikai leírás természetesen alkalmazható akkor is, ha más típusú spektrumokról van szó.

A valós számokkal reprezentált spektrum Fourier transzformáltja komplex függvény lesz, ezért az eljárás szemléltetésére nem a nehezen ábrázolható komplex interferogramot, hanem annak négyzetét, az infravörös spektrum teljesítményspektrumát ábrázolom.

A 78. a ábrán az egyszerűség kedvéért egyetlen Lorentz-görbéből álló elméleti (zaj nélküli) spektrumot látunk. A ν_1 pozíciójú, a_1 szélességű, az

$$L_1 = a_1^2 / ((\nu - \nu_1)^2 + a_1^2) \quad (61)$$

egyenlettel leírható Lorentz-görbe Fourier transzformáltja a következő függvény:

$$F(L_1) = \frac{1}{2} e^{-i2\pi\nu_1 x} e^{-2\pi a_1 |x|} . \quad (62)$$

A (62) egyenlet jobb oldala az első tényező miatt komplex. Ha a komplex konjugáltjával képzett szorzatát vesszük, akkor az ún. teljesítményspektrumhoz jutunk:

$$P(L_1) = \frac{1}{2} e^{-i2\pi\nu_1 x} e^{-2\pi a_1 |x|} \frac{1}{2} e^{i2\pi\nu_1 x} e^{-2\pi a_1 |x|} = \frac{1}{4} e^{-4\pi a_1 |x|} . \quad (63)$$

A teljesítményspektrum valós függvény, ami könnyen ábrázolható. Ennek azért van jelentősége, mert az általam kifejlesztett eljárás szerint a dekonvolúció optimális paramétereit majd egy ábráról fogjuk leolvasni.

Ezt a függvényt látjuk a 78. b ábrán. A következő ábrapáron (78. c és d ábrák) a fehérzajt, utána pedig (78. e, f) az előző elméleti spektrumok zajjal ($N(\nu)$) terhelt változatait mutatjuk be. Az elméleti spektrumhoz hozzáadott fehérzaj Fourier transzformáltjának várható értéke egy konstans függvény, maga a Fourier transzformált azonban egy konstans körül véletlenszerűen ingadozó függvény. Ezután a vonalalak függvény és transzformáltja következik (78. g, h ábra). A vonalalak esetünkben a spektrumvonallal azonos szélességű, de 0 középpontú Lorentz-görbe:

$$L(\nu) = a_1^2 / (\nu^2 + a_1^2) . \quad (64)$$

A Fourier öndekonvolúció elmélete szerint ennek a Fourier transzformáltjával ($F(L(\nu)) = \frac{1}{2} e^{-2\pi a_1 |x|}$) kell a mért spektrum (esetünkben az $L_1(\nu) + N(\nu)$ függvény) Fourier transzformáltját elosztani, hogy a dekonvolvált függvény Fourier transzformáltjához jussunk. Az így kapott

$$F(D'(\nu)) = e^{-i2\pi\nu_1 x} + F(N(\nu)) e^{2\pi a_1 |x|} \quad (65)$$

függvénynek a komplex konjugáltjával vett szorzatát mutatja a 78. j ábra. Amint már az (59) egyenlet analízisének említettük, az osztás során a zaj magasabb x értékhez tartozó komponensei felerősödnek (ld. a (65) egyenlet második tagja). A (65) egyenlet jobb oldalának inverz Fourier transzformáltjában a megnövekedett zaj elnyomja a jelet, ami esetünkben csak egyetlen ν értéknél (ν_1 -nél) különbözik

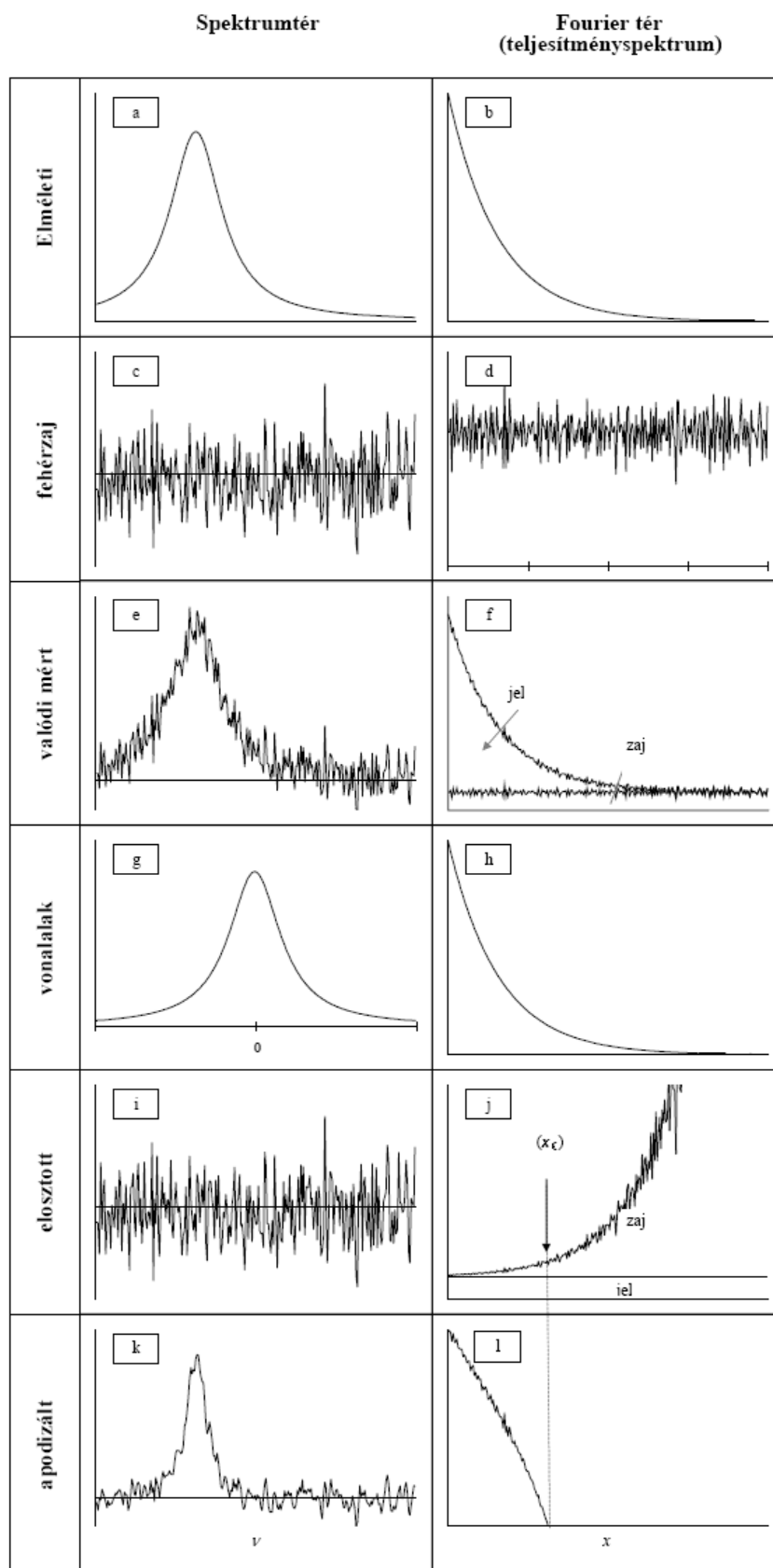
[†] Az FTIR mérés technikában az interferogram az $I(\nu)$ intenzitásfüggvény Fourier transzformáltja. Spektrumnak az abszorbanca ($A(\nu) = \lg(I_0(\nu)/I(\nu))$) függvényt tekintem, ahol I a mintával, I_0 pedig anélkül mért intenzitás.

nullától. (Matematikailag végtelen lenne, ugyanis Dirac-deltát kapunk a (65) első tagjának inverz Fourier transzformációjából, azonban a valóságban mindig diszkrét Fourier transzformációt végzünk, vagyis az n értékek csak bizonyos $\Delta\nu$ közönként állnak rendelkezésre, ezért az $e^{-i2\pi\nu_1 x}$ függvény inverz transzformáltja is véges amplitúdójú, ami eltűnik a felerősödött zajban (78. i ábra).)

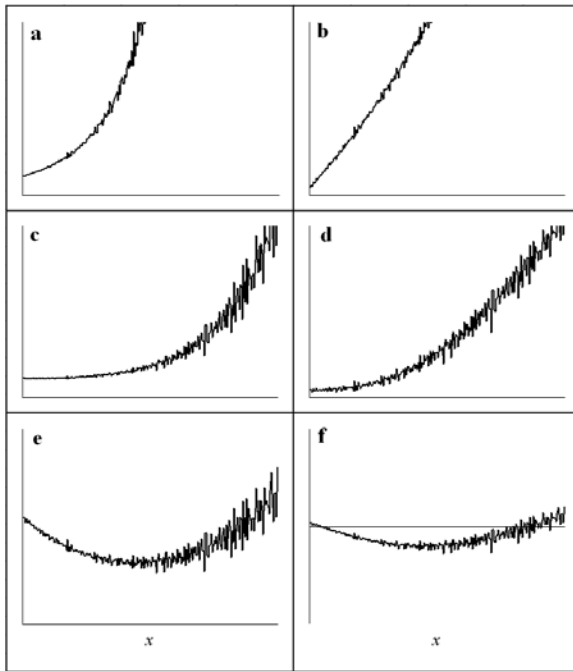
A zaj felerősödése miatt szükség van egy apodizációs függvényre, amely tulajdonképpen Fourier-szűrést valósít meg. A legtöbb ilyen függvény egy bizonyos x_c érték felett nulla értéket vesz fel, alatta pedig csökkenő tendenciájú, és x_c -nél lehetőleg „belesimul” a nullába. Ilyen függvények pl. a háromszögfüggvény és a háromszögfüggvény négyzete, vagy az FTIR technikában gyakran alkalmazott Happ-Genzel ill., Blackman-Harris függvények (Griffiths és Haseth, 2007).

Itt legalább két új paramétert vezetünk be, az x_c értéket, valamint az apodizációs függvény típusát. Módszerünkben az x_c érték optimális meghatározására koncentrálnak. A 78. j ábra megfigyelésével egyértelműen adódik, hogy azt a pontot kell meghatározni, ahol a jelalak függvény Fourier transzformáltjával leosztott zaj a jel Fourier transzformáltja fölé kezd emelkedni. Ha a jelalak függvényt jól választottuk meg, akkor a leosztás után előálló (65) egyenlet első tagja csak imaginárius kitevőt tartalmaz, azaz egységnyi abszolút értékű tag. Ez a teljesítményspektrumban (78. j ábra) egy konstans fog eredményezni. Ellenben a második tag egy exponenciálisan növekvő várható értékű, véletlenszerűen változó függvény lesz. Általában a (78. j) ábrán világosan megfigyelhető az a pont, ahol a (65) egyenlet második tagja kezd dominálni. Állításunk szerint ez az optimális x_c érték. Az általam kifejlesztett dekonvolúciós program (eltérően a kereskedelmi programoktól) megmutatja ezt a teljesítményspektrumot, és a felhasználó itt jelölheti ki az optimális x_c értéket.

Az apodizációs függvénnyel való szorzás utáni teljesítményspektrumot mutatja a (78. l) ábra. Az inverz Fourier transzformáció után jutunk a reálisan kapható dekonvolvált függvényhez (78. k ábra). Az apodizáció miatt ez nem Dirac-delta vékonyságú, hanem a szélességét az apodizációs függvény alakja és az x_c érték határozza meg. Az x_c érték csökkentésével a végeredmény szélesebb lesz, ami extrém esetben akár kompenzálhatja is a dekonvolúció okozta szélességcsökkentést.



78. ábra. A Fourier öndeconvolúció menete a spektrum- és a Fourier térben. (Részleteket ld. a szövegben.)



79. ábra. A 78. j. ábrának megfelelő teljesítményspektrum a), b) aluldekonvolváláskor; c), d) optimális szélességű vonalalak függvényével; e) f) túldekonvolválás esetén. Az y tengely az a), c), e) ábrákon lineáris, a b), d), f) ábrákon pedig logaritmikus.

Figyeljük meg, hogy minél jobb minőségű volt az eredeti spektrumunk (azaz minél kisebb az $N(\nu)$ zaj amplitúdója) annál nagyobb x_c értékeket választunk, azaz annál kisebb lesz a dekonvolúció után kapott spektrumvonal szélessége. Ebből azt a (szinte közhelyszerű) következtetést vonhatjuk le, hogy a dekonvolúcióhoz jó minőségű kiinduló spektrum szükségeltetik, ugyanis a dekonvolúció a spektrális vonalszélesség csökkentése mellett kiemeli a zajt is.

Az eddigiek alatt feltettük, hogy a spektrális vonalszélességet jól eltaláltuk, és éppen olyan a_1

szélességű vonalalak függvényével osztottunk le, amilyen a spektrumban szerepel. Mi történik, ha a dekonvolúcióhoz használt $L(\nu)$ vonalalak a szélessége a spektrális vonalalak a_1 szélességétől eltérő?

Az $L(\nu) = a^2/(\nu^2 + a^2)$ függvény Fourier transzformáltjával ($F(L(\nu)) = \frac{1}{2}e^{-2\pi a|x|}$) való osztás után a (65) egyenlet helyett a következőt kapjuk

$$F(D'(\nu)) = e^{-i2\pi\nu_1x} e^{-2\pi(a_1-a)x} + F(N(\nu))e^{2\pi a|x|}. \quad (66)$$

Most az első (a jelet tartalmazó) tag nem konstans amplitúdójú, hanem tartalmaz egy valós exponenciális tagot is. Az $a > a_1$ esetben, azaz, ha túl széles vonalalakot feltételezünk („túldekonvolválunk”), a jelből származó járulék a teljesítményspektrumban növekvő exponenciálisan mutat. Az ilyen teljesítményspektrum, ahol a (zajtól eltekintve) a függvény minimuma az $x=0$ -nál van, utána pedig monoton növekszik, annak a jele, hogy a vonalszélesség függvényt helytelenül választottuk

meg, mégpedig túl nagyra feltételeztük, tehát azt csökkenteni kell, ha nem akarjuk, hogy műtermékek jelenjenek meg a visszatranszformálás után (79. a) és b) ábra).

Ha „aluldekonvolválunk”, vagyis $a < a_1$, akkor a jelet tartalmazó tag csökkenő tendenciát mutat. Hasonlóan ez előző bekezdéshez, most azt mondhatjuk, hogy a kezdeti lecsengő tendencia azt mutatja, hogy a vonalalak függvényt túl keskenynek feltételeztük, azaz még nem használtuk ki a dekonvolúció adta lehetőségeket teljesen. Ezek az esetek láthatók a 79. e) és f) ábrán, ahol a 78. g ábrának megfelelő teljesítményspektrumokat tüntettük fel. Amint a 79. b), d) és f) ábrákon látható, a túl-ill. aluldekonváltság különösen jól felismerhető, féllogaritmikus ábrázolásban, ahol az exponenciálisan növekvő zaj-tag egyenesként ábrázolódik..

A teljesítményspektrum megfigyelése alapján tehát módunk van az a vonalszélesség-paramétert korrigálni, amíg el nem érjük azt az optimális esetet ($a=a_1$), amit a kezdeti szakasz konstans amplitúdójú voltából ismerhetünk fel.

Azt mondhatjuk tehát, hogy a teljesítményspektrum ábrázolása és megfigyelése a dekonvolúció megfelelő köztes lépése során nemcsak az optimális x_c érték kiválasztásában jelent segítséget, hanem a jelalak függvény optimális szélesség-paraméterének (a -nak) a meghatározásához is segítséget ad.

A dekonvolúció optimális végrehajtása ezek alapján a következők szerint történik:

1. Egy ésszerű becslést teszünk a vonalalak függvényre, és annak szélességére.
2. Kiszámoljuk a 78. j ábra szerinti teljesítményspektrumot
3. Szemrevételezzük a teljesítményspektrumot, és ha úgy néz ki, mint a
 - a: 79. a) ill. b) ábra (a kezdetektől növekszik) akkor csökkentjük a vonalszélesség paramétert (a -t), és visszamegyünk a 2. pontra.
 - b: 79. e) ill. f) ábra (először csökkenő tendenciát mutat) akkor növeljük a vonalszélesség paramétert (a -t), és visszamegyünk a 2. pontra.
 - c: 79. c) ill. d) ábra (egy vízszintes platóval indul), akkor továbbmegyünk a 4. pontra
4. A 78. j ábra szerint meghatározzuk a levágási pontot (x_c), és alkalmazzuk az ennek megfelelő apodizációs függvényt.

5. Kiszámoljuk az inverz Fourier transzformáltat.

Ezeket a szabályokat követve iteratív módon meghatározhatók az adott spektrumhoz tartozó optimális a és x_c paraméterek, amelyekkel a lehető legnagyobb vonalkeskenyedés-csökkentést lehet végrehajtani, a zaj túlzott megerősödése és műtermékek megjelenése nélkül.

Összefoglalva: Olyan módszert fejlesztettem ki, amellyel a dekonvolúció egyik köztes lépésében a teljesítményspektrum alapján interaktív módon megtalálhatók a dekonvolúció optimális paraméterei: az alakfüggvény szélessége és az apodizációs függvény levágási pontja. Megmutattam, hogy ha a teljesítményspektrum emelkedő tendenciát mutat, és minimuma (a zajból eredő ingadozástól eltekintve) a nulla retardációnál van, akkor a dekonvolúcióban alkalmazott vonalszélesség nagyobb a mért spektrum legalább egyik spektrumvonalának szélességénél. Ez az ún. „túldekonvolváláshoz” vezet, ami műtermékként negatív oldalsávokat eredményez. Ha a teljesítményspektrum csökkenő tendenciájú, a spektrumvonalak tovább keskenyíthetők, azaz a dekonvolúcióhoz használt alakfüggvény szélességének csökkentésével további felbontásnövelés érhető el. Megmutattam, hogy a maximálisan elérhető felbontás esetén a teljesítményspektrum az alacsony retardációknál konstans, majd a retardáció növekedésével a nagyfrekvenciás zajkiemelés miatt növekszik. Megmutattam, hogy optimális esetben az apodizációs függvény levágásának ott kell lennie, ahol a (növekvő) zajkomponens eléri a jel (konstans) értékét. A módszert gyakorlatba is átültettem, az optimális dekonvolúcióra Pascal nyelven programot írtam, amit az optimális dekonvolúciós paraméterek meghatározására használunk.

4. 11. A spektroszkópiában alkalmazott csúcspozíció-meghatározás pontosságának analízise. Matematikai formulák megadása, melyek segítségével a mért spektrumból a csúcspozíció hibája is kiszámolható. A módszer alkalmazása a nyomásértékek pontosságának meghatározására. (T11, P5, P6)

A Savitzky-Golay-féle csúcspozíció-meghatározó módszert széles körben alkalmazzák a spektroszkópiában. Az eredmények hibájának becslése azonban hiányzott a spektroszkópikusok kelléktárából.

Savitzky-Golay módszer szerint a spektrális csúcs közelében a mérési pontokra polinomot illesztünk, majd a polinom együtthatóinak felhasználásával analitikusan számoljuk ki a maximum helyét. Általában elég másodrendű polinomot illeszteni, azonban a szerzők az együtthatók meghatározásának módszerét magasabb rendű polinomok esetére is kifejlesztették (Savitzky és Golay, 1964).

Legyenek x_i, y_i ($i=0,1,2,\dots,n$) a mért spektrum pontjai. A módszer azon a zseniális meglátáson alapult, hogy – amennyiben az x_i -k egymáshoz képest azonos távolságra helyezkednek el ($x_i - x_{i-1} = \Delta x$, minden $i=1,2,3,\dots,n$ -re) – az illesztett polinom együtthatói a spektrum y értékeinek lineáris kombinációjaként fejezhetők ki, ami a számolást jelentős módon leegyszerűsíti. Az illesztett m -ed fokú polinom n -edik ($n=0,1,\dots,m$) együtthatója tehát az alábbiak szerint írható fel:

$$a_{m,n} = \frac{1}{C_{m,n}} \sum_{i=-k}^k c_{m,n,i} y_{i+i_0}, \quad (67)$$

ahol $C_{m,n}$ egy normálási tényező, a $c_{m,n,i}$ -k pedig súlyfaktorok. Ezzel az összefüggéssel az x_0 pont környezetében lévő $2k+1$ ($2k+1 > m$) pontra illesztünk polinomot. Savitzky és Golay megadták ezeket a $c_{m,n,i}$ ill. $C_{m,n}$ együtthatókat. (Savitzky és Golay, 1964). Később Steiner és mtsai, (1972) néhány együtthatót korrigáltak a számolásban.

Ha parabolát illesztünk ($m=2$), akkor az

$$x_{csúcspoz} = x_0 + \left(i_0 - \frac{a_{2,1}}{2a_{2,2}} \right) \Delta x \quad (68)$$

egyenlet adja meg a csúcs pontos pozícióját.

A csúcspozíció hibájának két fő oka lehet: a) A mérés statisztikus hibája. Ezt a mérőkészülék zaja, vagy a mért jelenség maga okozza (pl. fotonkibocsátás esetén a Poisson eloszlás), vagy esetenként mindkettő. b) A másik ok lehet a polinom nem megfelelő illeszkedése a spektrumra. Még ha nem lenne zaj, akkor sem lehetne egy Gauss- vagy Lorentz-görbét polinommal tökéletesen illeszteni. Ez a csúcspozíció szisztematikus hibáját okozhatja. A tökéletlen illeszkedésből eredő hibát az illesztésben részt vevő pontok száma erőteljesen befolyásolja. Túl nagy k választása esetén az illeszkedési hiba nő, túl kicsi k esetén a statisztikus hiba lesz nagyobb.

A legtöbb alkalmazás esetén nem annyira a vizsgált spektrális csúcs pozíciója maga, hanem annak eltolódása az, amire kíváncsiak vagyunk. Így a szisztematikus hibának kisebb jelentősége van, hiszen, ha nem változtatjuk a k paramétert, a szisztematikus hiba sem változik. Ezért, valamint azért mert a sztochasztikus hibát sokkal egzaktabban lehet figyelembe venni és követni, ezért a statisztikus hibára fogunk koncentrálni.

4.11.1. A csúcspozíció statisztikus hibája

Az $a_{m,n}$ együtthatók $\sigma_{m,n}$ standard hibáját (amit ezután csak hibának nevezek), pontosabban a hiba négyzetét, a hibaterjedés szabályai szerint az illesztésben használt y_i értékek σ_i szórásaiból a következő egyenlettel kaphatjuk meg:

$$\sigma_{m,n}^2 = \frac{1}{C_{m,n}^2} \sum_{i=-k}^k \left(c_{m,n,i} \right)^2 \sigma_{i+i_0}^2. \quad (69)$$

Ha a (68) egyenletet használjuk a csúcspozíció kiszámolásához, akkor ennek a pozíciónak a hibája:

$$\sigma_{csúcspoz} = \sqrt{\left(\frac{\partial x_{csúcspoz}}{\partial a_{2,1}} \right)^2 \sigma_{2,1}^2 + \left(\frac{\partial x_{csúcspoz}}{\partial a_{2,2}} \right)^2 \sigma_{2,2}^2}, \quad (70)$$

ami némi matematikai számolás után a

$$\sigma_{csúcspoz} = \frac{\Delta x}{2a_{2,2}^2} \sqrt{a_{2,2}^2 \sigma_{2,1}^2 + a_{2,1}^2 \sigma_{2,2}^2} \quad (71)$$

egyenletet adja. Megjegyzendő, hogy a (71) egyenlet alapján a csúcspozíciót akár nagyobb pontossággal is meghatározhatjuk, mint a spektrum lépésköze (Δx). Ehhez azonban nagyon pontos y_i értékekkel kell rendelkezünk.

Most sorra veszünk néhány tipikus spektroszkópai módszert, és közelebbről meghatározzuk a $\sigma_{\text{csúcspoz}}$ -t ezeknél a módszereknél.

4.11.2. A statisztikus hiba emissziós spektroszkópia esetén

Itt megvan az az előnyünk, hogy a jelenség matematikailag jól leírható, hiszen fotonszámlálós detektálás esetén a Poisson-eloszlás alkalmazható. Ekkor az x_i abszcisszájánál mérhető fotonszám várható értéke (μ_i) és szórása (σ_i) között a következő egyszerű összefüggés áll fenn:

$$\sigma_i^2 = \mu_i. \quad (72)$$

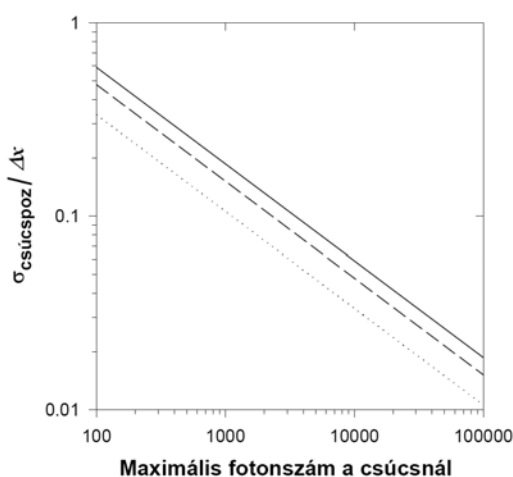
Ha μ_i -t a mért y_i -vel becsüljük és (72)-t a (69) egyenletbe behelyettesítjük, akkor a

$$\sigma_{m,n}^2 = \frac{1}{C_{m,n}^2} \sum_{i=-k}^k \left(c_{m,n,i} \right)^2 y_{i+i_0} \quad (73)$$

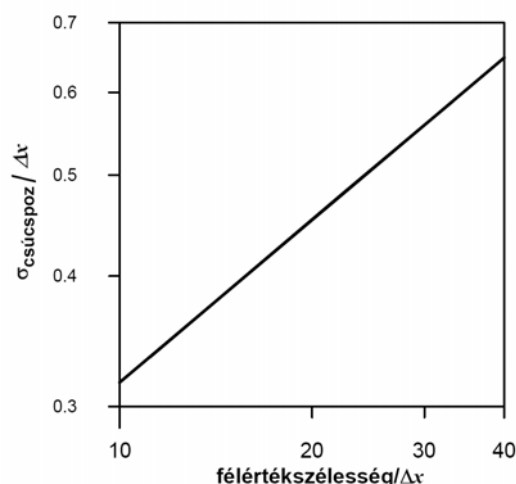
összefüggéshez jutunk. Figyeljük meg, hogy a $\sigma_{m,n}^2$ ugyanúgy az y_i -k lineáris kombinációjaként adódik, mint az $a_{m,n}$, csak a $\sigma_{m,n}^2$ esetén a lineáris kombinációban használt együtthatók négyzeteit kell alkalmazni. Ezek után a (71) egyenlet segítségével kapjuk a csúcspozíció hibáját.

A 80. ábra mutatja a csúcspozíció számított statisztikus hibáját Gauss-görbével leírható csúcs és Poisson eloszlású zaj esetén a csúcsonál mérhető fotonszám függvényében. Azt feltételeztük, hogy a maximum környezetében úgy illesztettünk, hogy a szélső pontokhoz tartozó fotonszám a maximum 70%-a legyen. (Ez azt jelenti, hogy a különböző k értékekhez tartozó csúcsok szélessége különböző!) A 81. ábra mutatja a teljes félértékszélesség függvényében az elérhető hibát, ha a fotonszám maximuma 100.

Meg kell jegyezni, hogy az eddig számolt és az ábrákon látható hiba ($\sigma_{\text{csúcspoz}}$) csak a statisztikus hiba, és bár úgy tűnhet, hogy nagyon kis hibát lehet elérni a fotonszám



80. ábra. A csúcspozíció statisztikus hibája Gauss-görbével leírható csúcs és Poisson-eloszlású zaj esetén a csúcson mérhető fotonszám függvényében. Az illesztésben használt pontok száma: $2k+1 = 25$ (—), 17 (---), 9 (···).



81. ábra. Az elérhető statisztikai hiba a teljes félértékszélesség függvényében, Poisson eloszlású zaj esetén, ha a fotonszám maximuma 100.

növelésével, ez csak látszólagos, ugyanis az illeszkedési hiba, ill. a mérés egyéb körülményeiből adódó hibák (pl. x -kalibráció hibája) állandó értékűek ($\sigma_{\text{egyéb}}$). Nyilván nem lehet ez alá csökkenteni a tényleges hibát, még akkor sem, ha a statisztikus hiba ezeknél kisebb, hiszen a tényleges hiba:

$$\sigma_{\text{csúcspoz, tényleges}} = \sqrt{\sigma_{\text{csúcspoz}}^2 + \sigma_{\text{egyéb}}^2} . \quad (74)$$

4. 11. 3. A statisztikus hiba abszorpciós spektroszkópia esetén

Az abszorpciós spektroszkópiában két intenzitást kell mérni: a mintán áthaladt I és a referencia I_0 intenzitást. Az abszorbancia:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} . \quad (75)$$

A legnagyobb probléma az, hogy nem ismerjük, hogy az I és az I_0 milyen elosztást követ. A különböző spektrális tartományokban eltérő elveken alapuló detektorokat alkalmaznak, amelyek mind más típusú zajt visznek be a mérésbe.

Amennyiben tudjuk, hogy az intenzitásokat fotonszámlálással detektáljuk, akkor a mérési adatok statisztikája ismert. Minden más esetben azonban nincsen

információnk a zajról, ezért ilyen esetekre olyan egyenletet adunk meg, amely egy mérhető paraméter segítségével fejezi ki a csúcspozíció hibáját.

Ha a detektor zajának statisztikája ismert, a kereskedelmi spektrométerek többsége akkor sem adja meg az I és az I_0 intenzitásokat, hanem csak az abszorbanciát.

Ha A_i jelenti az x_i értéknél mért $A_i = \lg(I_{0,i}/I_i)$ abszorbanciát, akkor ennek a hibája:

$$\sigma_i = \lg e \sqrt{\left(\frac{\sigma_{I,i}}{I_i}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{I_{0,i}}}{I_{0,i}}\right)^2}, \quad (76)$$

ahol $\sigma_{I,i}$ ill. $\sigma_{I_{0,i}}$ az I_i és az $I_{0,i}$ értékek szórásai. Ezekre az értékekre van szükségünk a csúcs közelében. Mivel a csúcspozíció $\pm k$ pontnyi környezete általában egy szűk spektrális tartomány, feltehetjük, hogy itt $I_{0,i}$ és ezért $\sigma_{I_{0,i}}$ is állandó (i -től független). A $\frac{\sigma_{I_{0,i}}}{I_{0,i}}$ hányadost kísérletileg is meg lehet határozni, ha az ember az üres spektrométerben (ill. mindkét fénypárból a referenciaoldatot téve) méri az abszorbancia szórását. Jelöljük ezt $\sigma_i^{(0)}$ -al. Mivel most $I_i = I_{0,i}$, ezért :

$$\frac{\sigma_{I_{0,i}}}{I_{0,i}} = \frac{\sigma_i^{(0)}}{\sqrt{2} \lg e}. \quad (77)$$

A (77) egyenlet segítségével meg lehet becsülni a σ_i -t. Attól függően, hogy mennyit tudunk a készülékről, különböző közelítéseket tehetünk.

A. A legegyszerűbb esetben σ_i -t $\sigma_i^{(0)}$ -al helyettesíthetjük. Mivel az intenzitás relatív hibája ($\sigma_{I,i}/I$) növekszik, ha I csökken (vagyis az abszorbancia növekszik), $\sigma_i^{(0)}$ a σ_i alsó becslésének tekinthető:

$$\sigma_i \geq \sigma_i^{(0)}. \quad (78)$$

Ha a (70) egyenletbe minden σ_i helyére $\sigma_i^{(0)}$ -t helyettesítünk, a (71)-es egyenletből a csúcspozíció hibájának alsó becslését kapjuk meg. A (70) egyenlet az említett helyettesítéssel az illesztett polinom együtthatói hibáinak négyzetére a következőt adja:

XIII. Táblázat.

A csúcspozíció hibájának számolásához szükséges együtthatók. (Részleteket ld. a szövegben.)

A S-G illesztésben alkalmazott pontok száma ($2k+1$):	25	23	21	19	17	15
$\tilde{c}_{2,1}$	$\frac{1}{\sqrt{1300}}$	$\frac{1}{\sqrt{1012}}$	$\frac{1}{\sqrt{770}}$	$\frac{1}{\sqrt{570}}$	$\frac{1}{\sqrt{408}}$	$\frac{1}{\sqrt{280}}$
$\tilde{c}_{2,2}$	$\frac{1}{\sqrt{13455}}$	$\frac{1}{\sqrt{8855}}$	$\frac{1}{\sqrt{33649}}$	$\frac{1}{\sqrt{6783}}$	$\frac{1}{\sqrt{1938}}$	$\frac{1}{\sqrt{6188}}$

A S-G illesztésben alkalmazott pontok száma ($2k+1$):	13	11	9	7	5
$\tilde{c}_{2,1}$	$\frac{1}{\sqrt{182}}$	$\frac{1}{\sqrt{110}}$	$\frac{1}{\sqrt{60}}$	$\frac{1}{\sqrt{28}}$	$\frac{1}{\sqrt{10}}$
$\tilde{c}_{2,2}$	$\frac{1}{\sqrt{1001}}$	$\frac{1}{\sqrt{429}}$	$\frac{1}{\sqrt{77}}$	$\frac{1}{\sqrt{21}}$	$\frac{1}{\sqrt{7}}$

$$\sigma_{m,n}^2 = \frac{(\sigma_i^{(0)})^2}{C_{m,n}^2} \sum_{j=-k}^k (c_{m,n,j})^2 \quad (79)$$

Figyeljük meg, hogy $\sigma_{m,n}$ független a spektrum aktuális abszorbancia értékeitől, de függhet ($\sigma_i^{(0)}$ -n keresztül) az x_i -től. Ezen közelítés szerint a $\sigma_{m,n}$ arányos $\sigma_i^{(0)}$ -val:

$$\sigma_{m,n} = \sigma_i^{(0)} \tilde{c}_{m,n}. \quad (80)$$

A $\tilde{c}_{m,n}$ együtthatók könnyen számolható, a méréstől nem függő konstansok. A XIII. táblázatban megadtam a $\tilde{c}_{2,1}$ és $\tilde{c}_{2,2}$ értékeit, különböző k -k esetén.

Tehát a mért $\sigma_i^{(0)}$ -ból a (80) egyenlet és a XIII. táblázat segítségével kiszámolt $\sigma_{m,n}$ értékeket a (71) egyenletbe behelyettesítve kapjuk a csúcspozíció hibájának alsó becslését.

B. Az abszorbancia hibájának állandósága helyett ésszerűbb közelítés azt feltételezni, hogy a mért intenzitás hibája állandó, azaz $\sigma_{I,i} \approx \sigma_{I_0,i}$. A (76) és (77) egyenletek felhasználásával az abszorbancia hibája:

$$\sigma_i = \sigma_i^{(0)} \sqrt{\frac{1}{2} \left(\left(\frac{I_{0,i}}{I_i} \right)^2 + 1 \right)} = \sigma_i^{(0)} \sqrt{\frac{1}{2} (10^{2A_i} + 1)}. \quad (81)$$

A csúcspozíció hibájának számolása most nem olyan egyszerű, mint az előbb, ezt a (81)-ből kiszámolt σ_i -t a (69)-be helyettesítve a (71) segítségével kaphatjuk meg. Ez nyilván nagyobb, de jobb becslés, mint az előző egyszerű gondolatmenettel kapott érték.

C. Ha az intenzitást fotonszámlálással mérjük, akkor még pontosabb becslést tudunk adni a csúcspozíció hibájára. Ebben az esetben az I_i és $I_{0,i}$ intenzitások az N_i és $N_{0,i}$ fotonszámokkal arányosak. Így az intenzitások relatív hibái:

$$\frac{\sigma_{I_{0,i}}}{I_{0,i}} = \frac{1}{\sqrt{N_{0,i}}} \quad (82a)$$

$$\frac{\sigma_{I,i}}{I_i} = \frac{1}{\sqrt{N_i}}. \quad (82b)$$

Ha ismerjük az N_i és $N_{0,i}$ értékeket, akkor a (82) egyenleteket a (76)-ba helyettesítve a (69) és (71) egyenletek segítségével kiszámolhatjuk a csúcspozíció hibáját.

Azonban a legtöbb spektrométer nem adja meg az N_i és $N_{0,i}$ értékeket, csak az abszorbanciát (A_i). Ekkor a kísérletileg meghatározott $\sigma_i^{(0)}$ segítségével juthatunk tovább. A (82) egyenleteket, valamint az $A_i = \lg(N_{0,i}/N_i)$ összefüggést felhasználva:

$$\left(\frac{\sigma_{I,i}}{I_i} \right)^2 = \frac{1}{N_i} = \frac{10^{A_i}}{N_{0,i}} = 10^{A_i} \left(\frac{\sigma_{I_{0,i}}}{I_{0,i}} \right)^2 \quad (83)$$

amiből (76) felhasználásával

$$\sigma_i = \frac{\sigma_{I_{0,i}}}{I_0} \lg e \sqrt{10^{A_i} + 1} = \sigma_i^{(0)} \sqrt{\frac{10^{A_i} + 1}{2}} \quad (84)$$

adódik. Innen, ahogy már megszoktuk, a (69) és (71) egyenletek segítségével adódik a csúcspozíció hibája.

Összegezve: Megadtam azokat a formulákat, amelyek segítségével a Savitzky-Golay módszerrel meghatározott csúcspozíció statisztikus hibája becsülhető. A képleteket megadtam a Poisson-eloszlást követő fotonszámlálásos emissziós spektroszkópiára, valamint abszorpciós spektroszkópiára is. Ez utóbbi esetben három közelítési módot alkalmaztam, attól függően, mennyi ismerettel rendelkezünk a spektrométerről. Alsó becslést adtam az együtthatók hibájára, amennyiben az I és I_0 intenzitások hibája külön-külön nem határozható meg, és csak az abszorbancia alapvonal hibájából becsülhetők. Táblázatos formában megadtam a számoláshoz szükséges konstansokat. Megadtam a hiba kiszámításának módját arra az esetre, amikor a zaj intenzitástól független fehérzaj. Ugyancsak megadtam a szükséges formulákat a harmadik tárgyalt esetben, amikor az intenzitásmérés fotonszámláláson alapul.

A módszert implementáltam, és az ezt használó programot spektroszkópai laboratóriumunkban a mai napig használjuk.

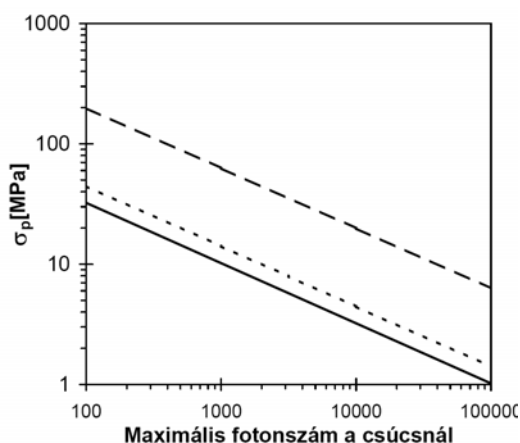
4. 11. 4. A nyomáskalibráció pontosságának becslése belső kalibránsok csúcspozíciójának a hibájából.

A nagy nyomás mérésére gyakran használnak belső kalibránst, amelynek egy jól definiált spektrumvonala a nyomás függvényében ismert módon tolódik el (Holzapfel, 1996). Ilyenkor a vonalpozíció meghatározásának pontossága behatárolja a nyomásmérés pontosságát. Szükség volt egy olyan módszer kidolgozására, amelynek segítségével a nyomás meghatározását limitáló sztochasztikus faktorok becsülhetővé váltak.

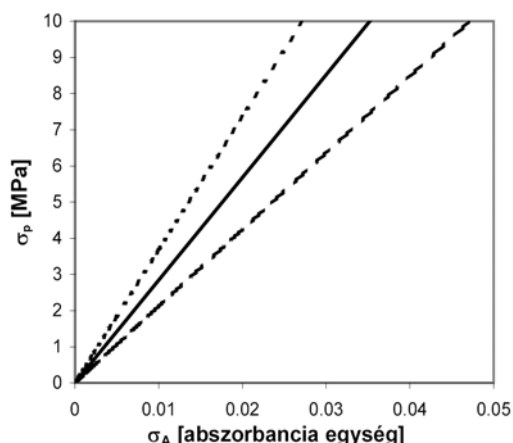
A módszer a spektrumvonalak pozíció-meghatározásának pontosságára kidolgozott módszerem továbbvitele.

A leggyakrabban alkalmazott nyomáskalibráns a rubin fluoreszcens vonala, amely atmoszferikus nyomáson és szobahőmérsékleten 694,3 nm-nél található. Ez a vonal a nyomástól függően eltolódik (Mao és mtsai, 1978):

$$p = f(x_{\text{csúcs}}) . \quad (85)$$



82. ábra. A rubin fluoreszcencia vonalának segítségével meghatározott nyomás várható statisztikus hibája a maximális fotonszám függvényében különböző paraméterekkel és hőmérsékleteken felvett spektrumok esetén. (—): $2k+1=25$, $T=300$ K, $\Delta x=0,2$ Å; (---): $2k+1=9$, $T=300$ K, $\Delta x=1$ cm⁻¹; (····): $2k+1=5$, $T=10$ K, $\Delta x=0,2$ Å.



83. ábra. Az infravörös spektroszkópiában alkalmazott BaSO₄ nyomáskalibránssal elérhető statisztikus hiba az abszorbanca szórásának függvényében. (—) $2k+1=7$, $p=100$ MPa; (---): $2k+1=5$, $p=100$ MPa; (····): $2k+1=5$, $p=5$ GPa. (További részleteket ld. a szövegben.)

Az alacsony nyomástartományokban (<10 GPa) az eltolódás arányos a nyomással (Forman és mtsai, 1972, Jayaraman, 1986), az $f(x)$ függvény meredeksége pedig

$$\frac{df(x)}{dx} = 0.365 \text{ nm/GPa.}$$

A nyomás hibáját egyszerűen a

$$\sigma_p = \frac{df(x)}{dx} \sigma_{\text{csúcspoz}} \quad (86)$$

egyenletből kaphatjuk, miután a $\sigma_{\text{csúcspoz}}$ -t a fotonszámlálós emissziós spektroszkópiára levezetett (73) és (71) egyenletekből kiszámoltuk. A 82. ábra mutatja a nyomás várható hibáját néhány tipikus esetben. Megjegyzendő, hogy bár a rubin vonal pozíciója a hőmérséklettől is függ, a $\frac{df(x)}{dx}$ meredekség még

kriogenikus hőmérsékleten sem változik (Noack és Holzapfel, 1979). A csúcs azonban kriogenikus hőmérsékleten jelentősen keskenyebb, mint szobahőmérsékleten. Ez magyarázza az illesztett pontok eltérő számát az ábrán.

A rubin mellett (főleg az infravörös spektroszkópiában) más belső kalibránsokat is alkalmaznak. Ilyenek például az α -kvarc (Wong és mtsai, 1985), valamint az általunk is használt bárium-szulfát (BaSO_4). Ez utóbbi esetben az $f(x)$ függvény nem lineáris, de a 983 cm^{-1} -es rezgési vonal nyomástól való függése jól leírható másodfokú polinommal (Wong és mtsai, 1989). Ebben az esetben tehát a hiba a nyomástól is függeni fog, mert a $\frac{df(x)}{dx}$ nem konstans. A 83. ábra mutatja a nyomás statisztikus hibáját abban a legegyszerűbb esetben, ha az abszorbancia hibáját állandónak (σ_A) tekintjük.

Összefoglalva: Megadtam a hiba kiszámításához szükséges formulákat a legáltalánosabban használt nyomáskalibráns, a rubin fluoreszcenciája és az infravörös mérésekben alkalmazott BaSO_4 esetére. Kiszámoltam és grafikusan megadtam a nyomás várható statisztikus hibáját erre a két nyomásmérési módszerre. Az általam megadott grafikonok alkalmasak arra, hogy róla a fluoreszcencia intenzitás (fotonszám) alapján a hiba mind szobahőmérsékleten, mind kriogenikus hőmérsékleten leolvasható legyen. Az infravörös mérés hibája az általam megadott grafikonon az abszorbancia hibája alapján olvasható le. Ezekkel a grafikonokkal a mérés hibája akkor is egyszerű leolvasással becsülhető, ha az adott laboratóriumban nincs a szoftverbe implementálva a módszer.

A kifejlesztett módszeren alapuló hibaszámítás a spektroszkópiai laboratóriumunkban használt rubin fluoreszcenciás nyomás-meghatározó programba bele van építve.

5. A bemutatott új tudományos eredmények tézispontokban való összefoglalása.

T1. Fehérjék másodlagos szerkezetének nagy nyomás hatására történő elasztikus változásának jellemzése *in situ* nyomáskísérletekben FTIR spektroszkópia segítségével. A módszert a gramicidin A-ra és a marha hasnyálmirigy tripszin inhibitorra (BPTI) alkalmaztuk. Megállapítottuk, hogy a gramicidin kettős hélix szerkezet és a csatorna konformáció közötti konformációs egyensúlya a nagy nyomás hatására eltolódik. Megmutattuk, hogy nagy nyomás alatt a csatorna konformáció preferált. Kiszámoltuk a két konformáció térfogata közti különbséget, amit a kettős hélix belsejében levő üreggel magyaráztunk. A BPTI esetén megállapítottuk, hogy a fehérje nem megy át irreverzibilis konformációs szerkezetváltozáson a 0-1,5 GPa nyomástartományban. Megállapítottuk, hogy a harmadlagos fehérjeszerkezet fellazulása 0,4 GPa alatt végbemegy, a másodlagos szerkezet változása nélkül. Megállapítottuk, hogy a másodlagos szerkezet elasztikus módon torzul 0,8 GPa felett, anélkül, hogy a fehérje denaturálódna.

T2. A H/D kicserélődés és a konformáció-változások egymásra hatásának vizsgálata 2D korrelációs FTIR spektroszkópiával. A 2D korrelációs analízissel sikerült szétválasztani a BPTI H/D kicserélődési és elasztikus deformációs jelenségeit. Megállapítottuk, hogy a kicserélődést egy kezdeti konformáció-változás indítja el, majd a H/D kicserélődés további konformációs átrendeződést indukál. Megmutattuk, hogy a kicserélődés a 0-0,3 GPa tartományban teljesen és irreverzibilisen végbemegy, nagyobb nyomásokon a teljesen deuterált fehérje további elasztikus szerkezetváltozást szenved.

A lipoxigenáz esetén bebizonyítottuk, hogy a víz által elérhető flexibilis régióknak a legkisebb a stabilitásuk a nyomással szemben. Ugyancsak bebizonyítottuk, hogy a fehérjének van egy belső merev magja, amely csak a teljes kitekeredéskor érhető el a víz számára. Szintén igazoltuk, hogy a másodlagos szerkezet egyes részei még a fehérje kooperatív kitekeredése után is megmaradnak.

T3. A nyomás-denaturácót követő újragombolyodás során intermedier állapotú fehérjeláncok keletkeznek, melyeknek fokozott aggregációra való hajlamuk van.

Megállapítottuk, hogy a nyomás-denaturációt követően a mioglobinnal intermedier állapotba kerül. Ez a félig feltekeredett fehérje-konformáció már a denaturációs hőmérséklet alatt aggregátumokat képez. Megállapítottuk, hogy ezek az aggregátumok nagy nyomás hatására disszociálódnak, valamint azt, hogy a hőmérséklet-denaturáció után kialakult aggregátumok is nyomásérzékenyek. A különböző hőmérsékleteken létrejött aggregátumok eltérő stabilitásából arra következtetünk, hogy csak az aggregáció kezdetén kialakuló elő-aggregátumok disszociálnak nagy nyomás hatására. Bebizonyítottuk, hogy a mioglobinnál tapasztalt viselkedés nem egyedi, az attól eltérő szerkezetű lipoxigenázban is hasonló intermedier szerkezeteket találtunk. A kísérletekben tapasztalt konformáció-változásokat egységes diagramban foglaltuk össze.

T4. Fehérje-kompresszibilitás mérése nagy nyomáson fluoreszcencia vonalkeskenyedés (FLN) módszerrel. A fehérje kompresszibilitásának új mérés technikáját vezettük be, amely a fluoreszcencia vonalkeskenyedési spektroszkópián alapul. Kidolgoztuk a módszer elméleti alapjait is. A módszert a DMSO mátrixba ágyazott magnézium mezoporfirinnel teszteltük, majd alkalmaztuk a magnézium mezoporfirinnel helyettesített tormaperoxidázra. Meghatároztuk a fehérje kompresszibilitását. Megalkottunk egy olyan modellt, amellyel értelmeztük az eltérő nyomástartományokban mért kompresszibilitások különbözőségét. A modellből levezettük, hogy a fehérjében eltérő kompresszibilitású domének vannak.

T5. A hő- nyomás- és hidegdenaturált fehérjeállapotok összehasonlítása FTIR spektroszkópiával és termodinamikai analízissel. Megállapítottuk, hogy mioglobin esetén a hideg- és nyomás-denaturáció során a másodlagos szerkezet részlegesen megmarad, a denaturáció utáni refolding pedig mindkét esetben olyan intermedierekhez vezet, amelyek a natívénál nagyobb aggregációs hajlamúak. Megállapítottuk, hogy a nyomás és hideg-denaturáció egymáshoz hasonló mind szerkezeti, mind pedig a termodinamikai hajtóerő szempontjából.

T6. A tormaperoxidáz enzim stabilitásának szerkezeti alapjai és ezek összefüggése a fehérje denaturációs hajlamával. Megállapítottuk a tormaperoxidáz különböző módokon destabilizált változatainak nyomásstabilitását, megállapítottuk, hogy a diszulfid hidak redukálása, a Ca^{2+} ionok eltávolítása, valamint a hem eltávolítása befolyásolta ugyan a stabilitást, de a fehérje merev doménje még ekkor is átlagon felüli stabilitást biztosított a megmaradt szerkezetnek. Megmutattuk, hogy a denaturáló nyomáskezelésen átesett fenti fehérjevariánsok visszatekeredésekor intermedier szerkezetek alakulhatnak ki. Az infravörös mérések értelmezésekor kimutattuk, hogy csak a hélixek belsejében levő aminosavakból ered a hélix szerkezetre jellemző infravörös sáv, a hélixek végén levő aminosavak ettől eltérő jelet adhatnak. Bebizonyítottuk, hogy a (fluoreszcens mérésekhez gyakran használt) fémmentes porfirinnel történő helyettesítés a fehérje stabilitását nem rombolja le.

T7. A fehérjék elliptikus fázisdiagramjának kiterjesztése, az aggregált és intermedier állapotok figyelembevétele a fázisdiagramon. Számolásainkkal bebizonyítottuk, hogy az elliptikus fázisdiagram alakja nem változik drasztikusan, ha a denaturált és natív állapot közti kompresszibilitás-, hőtágulási együttható-, ill. fajhő-különbségeknek a hőmérséklettől ill. nyomástól való függését is figyelembe vesszük. Továbbá kiegészítettük a fázisdiagramot a méréseinkben tapasztalt intermedier és aggregált fázisokkal, így az a kiegészítések után metastabil fázisokat is tartalmaz. Az így kialakult diagram segítségével sikerült megmagyarázni a mioglobinton és más fehérjéken végzett méréseink során a nyomás és hőmérséklet változtatásával kapott fehérjeszerkezeti átalakulásokat. Megállapítottuk, hogy a mioglobin hődenaturációja után kialakult aggregátumok nem csak nagy nyomás hatására, hanem magas hőmérsékleten is disszociálódnak.

T8. Kis hő-sokk fehérjék oligomerizációjának és chaperon funkciójának kapcsolata. Megmutattuk, hogy az alfa krisztallin oligomerek nagy nyomással indukált megnövekedett chaperon aktivitásával egyidejűleg a monomerek közti intermolekuláris béta típusú kölcsönhatások is eltűnnek. Ebből a fényszórás mérésekkel együtt azt bizonyítottuk, hogy az oligomer fellazulása szükséges az aggregációt gátló hatáshoz. Az MjHSP16,5 esetén megállapítottuk, hogy a dimerek nem esnek szét a chaperon aktivitást növelő nyomáskezelés esetén sem. Továbbá

megmértük az MjHSP16,5 extrém nyomás és hőmérsékleti stabilitásának paramétereit.

T9. A protoklorofillid fototranszformációjának az azt követő Shibata-eltolódás aktivációs térfogatának meghatározása. A NADPH:protoklorofillid oxidoreduktáz enzim által katalizált folyamatnak, a protoklorofillid fény hatására bekövetkező klorofilliddé alakulásának aktivációs tréfogatát határoztuk meg. Az aktivációs térfogatokból két párhuzamos reakcióútvonal létezését bizonyítottuk. Megmutattuk, hogy az enzim nem megy át irreverzibilis változáson a vizsgált ($\leq 0,5$ GPa) tartományban. A fototranszformációt követő spektrális Shibata-eltolódás mögötti szerkezetátalakulás aktivációs paramétereit (aktivációs tréfogat és energia) is meghatároztuk.

T10. A fehérjék FTIR spektrumának analizálásához szükséges Fourier öndekonvolúció optimális paramétereinek meghatározására kifejlesztett módszer. Ezzel a módszerrel a lehető legnagyobb vonalkeskenyedés mellett elkerülhető a műtermékek megjelenése. A módszer lényege, hogy a dekonvolúció egyik közbülső lépése során a teljesítmény-spektrum alapján lehet megállapítani, hogy a dekonvolúciós vonalszélesség optimális-e, valamint az apodizációs függvény optimális levágási pozícióját is itt lehet meghatározni.

T11. A spektrumvonalak pozíció-hibájának meghatározására kifejlesztett módszer. A spektroszkópiában széles körben alkalmazott (Savitzky és Golay által kifejlesztett) csúcspozíció meghatározás pontosságát analizáltam, és megadtam azokat a matematikai formulákat, amelyekkel a mért spektrumból a csúcspozíció hibája is kiszámolható. Az általam levezetett képletek bármilyen abszorpciós és emissziós spektroszkópia esetén is használhatóak. A módszert a nyomásméréseknél széles körben alkalmazott belső kalibránsok által meghatározott nyomásértékek pontosságának meghatározására alkalmaztam.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Fidy Judit professzor asszonynak, a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetének igazgatójának, és a Lézerspektroszkópiai Laboratórium vezetőjének, aki mindvégig biztatott munkám során, szakmai tanácsaiért és támogatásáért.

Prof. Karel Heremansnak a Leuveni Katolikus Egyetem Kémiai Intézete Kémiai és Biológiai Dinamika Laboratóriumában, akinél a nagy nyomású technikát tanultam, aki a nagy nyomás alatti fehérjekutatásba bevezetett, és akivel azóta is gyümölcsöző tudományos kapcsolatot ápolunk, a hosszú évek alatti segítőkészségéért és a vele folytatott inspiráló diszkusszióikért.

A Biofizikai Intézet LSL labor minden tagjának az egyszerre tudományos és baráti légkörért, segítőkészségükért. Külön köszönet Kaposi Andrásnak aki az FLN méréseknél a lézer „életben tartásában” segített, Árpádiné Markács Rózsának, aki a hivatkozási lista összegyűjtésének aprólékos munkáját végezte, Böde Csabának, aki az alfa-krisztallinos mérésekben segédkezett, Tölgyesi Ferencnek és Osváth Szabolcsnak a tudományos diszkusszióikért és Herényi Leventének a disszertáció alapos átolvasásáért és értékes kommentárjaiért.

Köszönet a leuveni laborban Peter Rubensnek, Filip Meersmannak és Carolien Dirixnek, PhD hallgatóknak, technikai segítségükért és főleg Filip Meersmannak aki biológusként a problémákat eltérő megvilágításban látta, mint egy fizikus.

Köszönettel tartozom Böddi Béla professzornak az ELTE Növény-szervezettani Tanszék vezetőjének és Solymosi Katalinnak, akikkel a búza POR enzimének tanulmányozása során folytattunk sikeres kooperációt, a közös mérésekben és gondolkodásban nyújtott segítségükért.

Nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak, azért, hogy segítettek, mellettem álltak, és elviselték a tudományos munkával járó minden nehézséget.

És végül köszönettel tartozom még sokaknak, akiktől tanulhattam, és akik tudományos munkám során biztattak, segítettek, vagy jóindulatúan korholtak.

7. A tézispontokhoz kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

- P1. **Smeller, L., Goossens, K., Heremans, K** (1995)
Determination of the secondary structure of proteins at high pressure *Vibrational Spectroscopy* 8, 199-203.
- P2. **Smeller, L., Goossens, K., Heremans, K** (1995)
How to minimize certain artifacts in Fourier self-deconvolution *Applied Spectroscopy* 49, 1538-1542.
- P3. **Goossens, K., Smeller, L., Frank, J., Heremans, K** (1996)
Pressure-tuning the conformation of bovine pancreatic trypsin inhibitor studied by fourier transform infrared spectroscopy *European Journal of Biochemistry* 236, 254-262.
- P4. **Smeller, L., Heremans, K** (1997)
Some thermodynamic and kinetic consequences of the phase diagram of protein denaturation *High Pressure Research in Bioscience and Biotechnology*, Ed. K. Heremans, Leuven University Press, pp. 55-58.
- P5. **Smeller, L** (1998)
How precise are the positions of the computer determined peaks? *Applied Spectroscopy* 52, 1623-1626.
- P6. **Smeller, L** (1999)
On the precision of the pressure determination by internal calibrants *Physica B* 265, 268-271.
- P7. **Smeller, L., Rubens, P., Heremans, K** (1999)
Pressure effect on the temperature induced unfolding and tendency to aggregate of myoglobin *Biochemistry* 38, 3816-3820.
- P8. **Smeller, L., Heremans, K** (1999)
2D FT-IR spectroscopy analysis of the pressure induced changes in proteins *Vibrational Spectroscopy* 19, 375-378.
- P9. **Smeller, L., Rubens, P., Frank, J., Fidy, J., Heremans, K** (2000)
Two dimension Fourier transform infrared correlation spectroscopy study of the high pressure tuning of proteins *Vibrational Spectroscopy* 22, 119-125.
- P10. **Smeller, L., Rubens, P., Heremans, K** (2000)
Pressure unfolding facilitates the formation of temperature gels *High Pressure Research* 19, 713-719.

- P11. **Smeller, L., Fidy, J** (2002)
The enzyme horseradish peroxidase is less compressible at higher pressures *Biophysical Journal* 82, 426-436.
- P12. **Meersman, F., Smeller, L., Heremans, K** (2002)
Comparative Fourier Transform Infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin *Biophysical Journal* 82, 2635-2644.
- P13. **Smeller, L** (2002)
Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure et Molecular Enzymology* 1595, 11-29.
- P14. **Solymosi, K., Smeller, L., Böddi, B., Fidy, J** (2002)
Activation volumes of processes linked to the phototransformation of protochlorophyllide determined by fluorescence spectroscopy at high pressure *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1554, 1-4.
- P15. **Smeller, L., Meersman, F., Fidy, J., Heremans, K** (2003)
High pressure FTIR study of the stability of horseradish peroxidase. Effect of heme substitution, ligand binding, Ca⁺⁺ removal and reduction of the disulfide bonds *Biochemistry* 42, 553-561.
- P16. **Böde, Cs., Tölgyesi, F., Smeller, L., Heremans, K., Avilov, S., Fidy, J** (2003)
Chaperone-like activity of α -crystallin is enhanced by high-pressure treatment *Biochemical Journal* 370, 859-866.
- P17. **Smeller, L., Solymosi, K., Fidy, J., Böddi, B** (2003)
Activation parameters of the blue shift (Shibata shift) subsequent to protochlorophyllide phototransformation *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics* 1651, 130-137.
- P18. **Smeller, L., Fidy, J., Heremans, K** (2004)
Protein folding, unfolding and aggregation. Pressure induced intermediates states on the refolding pathway of horseradish peroxidase *Journal Physical Condensed Matter* 16, S1053-S1058.
- P19. **Tölgyesi, F., Böde Cs., Smeller, L., Kim, K. K., Heremans, K., Fidy, J.** (2004) Pressure activation of the chaperone function of small heat-shock proteins *Cellular and Molecular Biology* 50, 361-369.
- P20. **Meersman, F., Smeller, L., Heremans, K** (2005)
Extending the pressure-temperature state diagram of myoglobin *Helvetica Chimica Acta* 88, 546-556

8. Irodalomjegyzék

- Antal, J. (szerk.)** (1980) Fizikai kézikönyv műszakiaknak. *Műszaki könyvkiadó* Budapest, pp. I. 1161.
- Artus, NN., Ryberg, M., Lindsten, A., Ryberg, H., Sundqvist, C** (1992) Shibata shift and the transformation of etioplasts to chloroplasts in wheat with clomazone (FMC 57020) and amiprofos-methyl (tokunol M) *Plant Physiol.* 98 253-263.
- Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P** (Eds) (1992) From living systems to biomolecules, High Pressure and Biotechnology. John Libbey and Company Ltd, London
- Balny, C. Mozhaev, V.V. Lange, R.** (1997) Hydrostatic pressure and proteins basic concepts and new data *Comp Biochem Physiol.* 116a, 299-304.
- Balog, E., Kis-Petik, K., Fidy, J., Köhler, M., Friedrich, J** (1997) Interpretation of multiple (0,0) bands in the absorption spectrum of Mg mesoporphyrin embedded in horseradish peroxidase *Biophys. J.* 73, 397-405.
- Balog, E., Becker, T., Oettl, M., Lechner, R., Daniel, R., Finney, J., Smith, J. C.,** (2004) Direct determination of vibrational density of states change on ligand binding to a protein *Phys. Rev. Lett.* 93, Art. No. 028103
- Bandekar, J** (1992) Amide modes and protein conformation *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 123-143.
- Bartnett, J. D., Block, S., Piermarini G. J** (1973) An optical fluorescence system for quantitative pressure measurements in the diamond anvil cell (Original paper on Ruby Scale) *Rev Sci Instrum.* 44, 1-9.
- Belyaeva, O. B., Griffiths, W. T., Kovalev, J. V., Timofeev, K. N., Litvin, F. F.** (2001) Participation of free radicals in photoreduction of protochlorophyllide to chlorophyllide in an artificial pigment-protein complex. *Biochemistry (Moscow)* 66, 173-177.
- Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson, W.L., Fraser, P.E., Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E., Blake, C.C.F., Pepys, M.B** (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis *Nature*, 385, 787-793.
- Bova, M. P., Ding, L.-L., Horwitz, J. and Fung, B. K.-K.** (1997) Subunit exchange of α A-crystallin. *J. Biol. Chem.* 272, 29511-29517.
- Böddi, B., Kovács, K., Láng, F.** (1983) Spectroscopic properties of protochlorophyll forms in Triton X-100 detergent micelles. *Biochem Biophys Acta* 722, 320-323.
- Böddi, B., Lindsten, A. Ryberg, M., Sundqvist, C** (1989) On the aggregational states of protochlorophyllide and its protein complexes in wheat etioplasts, *Physiol. Plant.* 76, 135-143.
- Böddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M., Sundqvist, C.** (1990) Phototransformation of aggregated forms of protochlorophyllide in isolated etioplast inner membranes. *Photochem Photobiol* 52, 83-87.
- Böddi, B., Ryberg, M., Sundqvist, C.** (1991) The formation of a short-wavelength chlorophyllide form at partial phototransformation of protochlorophyllide in etioplast inner membranes. *Photochem. Photobiol.* 53, 667-673.
- Böde, Cs., Smeller, L., Massoon, P., Fidy, J., Tölgyesi, F.,** publikálatlan eredmény

- Bracewell, R. N.** The Fourier transformation and its applications, McGraw-Hill Book Company New York 1986.
- Bridgman, P. W.** (1911) Water in the liquid and five solid forms, under pressure *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 47, 441-558.
- Bridgman, P. W.** (1914) The coagulation of albumen by pressure *J. Biol. Chem.* 19 511-512.
- Bridgman, P. W.** (1935) The pressure-volume-temperature relations of the liquid, and the phase diagram of heavy water *J. Chem. Phys.* 3, 597-605.
- Brunne, R. M., Gunsteren, W. F** (1993) Dynamical properties of bovine pancreatic trypsin inhibitor from a molecular dynamics simulation at 5000 atm *FEBS Lett.* 323, 215-217.
- Burgio, M. R., Kim, C. J., Dow, C. C. Koretz, J. F.** (2000) Correlation between the chaperone-like activity and aggregate size of α -crystallin with increasing temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 426-432
- Butler, W. L., Briggs, W. R.** (1966) The relation between structure and pigments during the first stages of proplastid greening. *Biochim. Biophys. Acta* 112, 45-53.
- Byler, D. M., Susi, H** (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra *Biopolymers*, 25, 469-487.
- Byler, D. M. Susi, H** (1995) Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Enzymes *Methods Enzimol.* 130, 290-311.
- Chattopadhyay, K. and Mazumdar, S.** (2000) Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: Effect of temperature and pH *Biochemistry* 39, 263-270.
- Chirchadze, Yu. N., Newskaya, N. A** (1976) Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet *Biopolymers* 15, 607-625.
- Clark, A. H., Saunderson, D.H., Sugget, A** (1981) Infrared and laser-Raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels *Int. J. Pept. Res.* 17, 353-364.
- Clark, N. A.,** (1979) Thermodynamics of the re-entrant nematic-bilayer smectic A transition *J. Physique Coll. C3 suppl.* 40, C3-345-C3-349.
- Cooper, A** (1976) Thermodynamic fluctuations in protein molecules *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2740-2741.
- Creighton, T. E** (1993) Proteins Structures and Molecular Properties *W.H. Freeman and Company New York.*
- Das, K. P., Surewicz, W. K.** (1995) On the substrate specificity of α -crystallin as a molecular chaperone. *Biochem. J.* 311, 365-383.
- Datta, S. A., Rao, C. M.** (1999) Differential temperature-dependent chaperone-like activity of α A- and α B-crystallin homoaggregates *J. Biol. Chem.* 274, 34773-34778.
- Delaye, M., Tardieu, A** (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature (London)* 302, 415-417.
- Denisov, V.P., Jonsson, B-H. and Halle, B.** (1999) Hydration of denatured and molten globule proteins *Nature. Struct. Biol.*, 6, 253-260.
- Derham, B. K., Harding, J. J.** (1997) Effects of aging on the chaperone-like function of human α -crystallin assessed by three methods. *Biochem. J.* 328, 763-768

- Derham, B. K., Harding, J. J.** (2002) Effect of modifications of α -crystallin on its chaperone and other properties. *Biochem. J.* 364, 711-717.
- Dobson, C. M.** (2001) The Structural Basis of Protein Folding and its Links with Human Disease", *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* 356, 133-145.
- Dong, A., Huang, P., Caughey, W.S.,** (1990) Protein secondary structures in water from 2nd derivative amide I infrared-spectra *Biochemistry* 29, 3303-3308.
- Dong, A., Randolph, T. W., Carpenter, J. F.** (2000) Entrapping intermediates of thermal aggregation in α -helical proteins with low concentration of guanidine hydrochloride *J. Biol. Chem.* 275, 27689-27693.
- Dousseau, F., Pezolet, M.** (1990) Determination of the secondary structure-content of proteins in aqueous-solutions from their amide-I and amide-II infrared bands – Comparison between classical and partial least-squares methods *Biochemistry*, 29, 8771-8779.
- Dujardin, E., Correia, M.** (1979) Long-wavelength absorbing pigment-protein complexes as fluorescence quenchers in etiolated leaves illuminated in liquid nitrogen. *Photobiochem. Photobiophys.* 12, 97-105.
- Dzwolak, W., Ravindra R., and Winter R.** (2004) Hydration and Structure – the Two Sides of the Insulin Aggregation Process, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 1938-1943.
- Dzwolak, W., Ravindra, R., Lendermann, J., Winter, R.** (2003) Aggregation of bovine insulin probed by DSC/PPC calorimetry and FTIR spectroscopy, *Biochemistry* 42, 11347-11355.
- Eaton, W.A., Muñoz, V., Hagen, S.J., Jas, G.S., Lapidus, L. J. Henry, E.R., Hofrichter, J** (2000) Fast kinetics mechanism in protein folding *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 327-359.
- Eisenberg, D., Kauzmann, W.** (1969) The structure and properties of water. At the Clarendon Press, Oxford.
- Englander, S. W.** (2000) Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 213-238.
- Englander, S. W., Sosnick, T. R., Englander, J. J., Mayne, L.** (1996) Mechanisms and uses of hydrogen exchange *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 18-23.
- Fabian, H., Schultz, C., Naumann, D., Landt, O., Hahn, U. Saenger, W.** (1993) Secondary structure and temperature-induced unfolding and refolding of ribonuclease T1 in aqueous solution. A Fourier transform infrared spectroscopic study. *J. Mol. Biol.* 232, 967-981.
- Farahbakhsh, Z. T., Huang, Q. L., Ding, L. L., Altenbach, C., Steinhoff, H. J., Horwitz, J. and Hubbell, W. L.** (1995) Interaction of α -crystallin with spin-labelled peptides. *Biochemistry* 34, 509-516.
- Farnsworth, P. N., Frauwirth, H., Groth-Vasselli, B., Singh, K.** (1998) Refinement of 3D structure of bovine lens α -crystallin. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 175-185
- Fidy, J., Vanderkooi, J.M., Zollfrank, J., Friedrich, J.** (1992) Softening of the packing density of horseradish-peroxidase by a H-donor bound near the heme pocket *Bioophys. J.* 63, 1605-1612.
- Fink, A.L** (1998) Folding aggregates, inclusion bodies and amyloid *Folding and Design*, 3, R9-R23
- Floriano, W.B., Nascimento, M.A.C., Domont, G.B. Goddard, W.A.** (1998) Effects of pressure on the structure of metmyoglobin: Molecular dynamics

- predictions for pressure unfolding through a molten globule intermediate. *Prot. Sci.* 7, 2301-2313.
- Forman, R. A. Piermarini, G. J. Barnett, J. D. Block, S** (1972) Pressure measurements made by the utilisation of ruby sharp-line luminescence *Science* 176, 284-285.
- Franke, A., Roncaroli, F., van Eldik, R.** (2007) Mechanistic Studies on the Activation of NO by Iron and Cobalt Complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 6, 773–798.
- Fraunfelder, H., Alberding, NA, Ansari, A., Braunstein, D., Cowen, BR., Mi, KY., Iben, IET., Johnson, JB., Luck, S., Marden, MC., Mourant, JR., Ormos, P., Reinisch, L., Scholl, R. Schulte, A. Shyamsunder, E., Sorensen, L. B., Steinbach, P. J., Xie, A., Young, R. D., Yue, K. T** (1990) Proteins and Pressure *J. Phys. Chem.* 94, 1024-1037.
- Friedrich, J., Haarer, D.** (1984) Photochemical hole burning: A spectroscopic study of relaxation processes in polymers and glasses, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23, 113-140.
- Gaffney, B. J** (1996) Lipxygenases: structural principles and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25, 431-459.
- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T. and Poulos, T. L.** (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution *Nature Structural Biology* 4, 1032-1038.
- Gekko, K** (1991) Flexibility of globular proteins in water as revealed by compressibility *In Water Relationship in Food Plenum*. H., Levine, L., Slade, editors. New York. 753-770.
- Gekko, K.** (2002) Compressibility gives new insight into protein dynamics and enzyme function *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure et Molecular Enzymology* 1595, 382-386.
- Gekko, K., Hasegawa, Y** (1986) Compressibility-Structure Relationship of Globular Proteins *Biochemistry* 25, 6563-6571.
- Glascot, P. K., Long, F. A.,** (1960) Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide, *J. Phys. Chem.* 64, 188-190.
- Gribov, L. A., Sztyepanov, B. I., Jeljasevics, M. A., Volkenstejn N. V.** (1979) *Molekularezhések*, Akadémiai kiadó, Budapest.
- Griffiths, P. R., Haseth, J. A.** (2007) Fourier transform infrared spectrometry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Griko, Y.V., Kutysenko, V.P** (1994) Differences in the Processes of Lactoglobulin Cold and Heat Denaturations. *Biophys. J.* 67, 356-363.
- Gu, L., Abulimiti, A., Li, W., Chang, Z** (2002) Monodisperse Hsp16.3 nonamer exhibits dynamic dissociation and reassociation, with the nonamer dissociation prerequisite for chaperone-like activity. *J. Mol. Biol.* 319: 517-526.
- Haris, P. I., Chapman, D.** (1988) Fourier-transform infrared-spectra of the polypeptide alamethicin and a possible structural similarity with bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta* 943, 375-380.
- Hawley, S.A.** (1971) Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen *Biochemistry* 10, 2436-2442.
- Heinisch, O., Kowalski, E., Goossens, K., Frank, J., Heremans, K., Ludwig, H., Tauscher, B.** (1995) Pressure effects on the stability of lipxygenase: Fourier

- transform-infrared spectroscopy (FT-IR) and enzyme activity studies, *Z. Lebensm-Unters. Forsch.* 201, 562-565
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C** (1998) Effects of high pressure on enzymes related to food quality *Trends Food Sci. Technol* 9, 197-203.
- Henriksen, A., Schuller, D. J., Meno, K., Welinder, K. G., Smith, A. T., Gajhede, M.** (1998) Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by x-ray crystallography *Biochemistry* 37, 8054-8060.
- Heremans, K.** (1982) High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 11, 1-21.
- Heyes D. J., Ruban A. V., Wilks H. M., Hunter N. C** (2002) Enzymology below 200 K: the kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase. *Procl Natl Acad Sci USA* 99 11145-11150.
- Holzbaur, I. E., English, A.M. and Ismail A. A.** (1996) FTIR Study of the Thermal Denaturation of Horseradish and Cytochrome C Peroxidase in D₂O *Biochemistry* 35 5488-5494.
- Horwitz, J** (2003) Alpha-crystallin. *Exp Eye Res.* 76: 145-153.
- Hozapfel, W. B.** (1996) Limits in Present Static Pressure Metrology in. *Trzeciakowski W. A. (Ed.), High Pressure Sciences and Technology*, World Scientific, Singapore, p 69.
- Huang, G.S., Oas, T.G** (1996) Heat and Cold Unfolded States of Monomeric Repressor Are Thermodynamically and Conformationally Equivalent. *Biochemistry* 35, 6173-6180.
- Ismail, A. A., Mantsch, H. H., Wong, P. T. T** (1992) Aggregation of Chymotrypsinogen: Portrait by FT-IR Spectroscopy *Biochim. Biophys. Acta* 1121, 183-188.
- Jayaraman, A.** (1986) Ultrahigh pressures *Rev. Sci Instrum* 57, 1013-1031.
- Jennings, P. A., Wright, P. E** (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin *Science.* 262, 892-896.
- Kabsch, W., Sander, C.** (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- Kamiyama, T., Gekko, K.** (2000) Effect of ligand binding on the flexibility of dihydrofolate reductase as revealed by compressibility *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure et Molecular Enzymology* 1478, 257-266.
- Kaposi, A. D., Logovinsky, V., Vanderkooi, J.. M.** (1992) Definition of the energy map and its applications to the study of chromophores in proteins *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* 1640, 792-799.
- Kaposi, A.D., Vanderkooi, J.M.** (1992) Vibronic energy map and excited state vibrational characteristics of magnesium myoglobin determined by energy-selective fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11371-11375.
- Kaposi, A.D., Fidy, J., Manas, E. S., Vanderkooi, J. M., Wright, W. W.** (1999) Horseradish peroxidase monitored by infrared spectroscopy: effect of temperature, substrate and calcium, *Biochem. Biophys. Acta* 1435, 41-50.
- Kaposi, A. D., Fidy, J., Stavrov, S., Vanderkooi, J.. M.** (1993) Optical fine-structure investigation of porphyrin-protein interactions: magnesium and metal-free myoglobins *J. Phys. Chem.* 93, 6319-6327.

- Karplus, M., Petsko, G. A** (1990) Molecular dynamics simulations in biology *Nature* 347, 631-639.
- Kauppinen, J. K., Moffat, D. J., Mantsch, H. H., Cameron, D. G** (1981a) Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands *Appl. Spectrosc.* 35, 271-276.
- Kauppinen, J. K., Moffat, D. J., Mantsch, H. H., Cameron, D. G** (1981b) Self-deconvolution and first order derivatives using Fourier transforms, *Anal. Chem.* 53, 1454-1457.
- Kelly, J.W** (1997) Amyloid fibril formation and protein misassembly: a structural quest for insights into amyloid and prion diseases *Structure*, 5, 595-600.
- Killian, J. A** (1992) Gramicidin and gramicidin-lipid interactions *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Rev. Biomembranes*, 1113, 391-425.
- Kim, D.R., Lee, I., Ha, S.C. and Kim, K.K.**, (2003) Activation mechanism of HSP16.5 from *Methanococcus jannaschii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307: 991-998.
- Kim, K.K., Kim, R., Kim, S.H** (1998a) Crystal structure of a small heat-shock protein *Nature* 394: 595-599.
- Kim, K.K., Yokota, H., Santoso, S., Lerner, D., Kim, R. and Kim, S.H.**, (1998b) Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic data analysis of small heat shock protein homolog from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile *J. Struct. Biol.*, 121, 76-80.
- Kim, R., Kim, K.K., Yakota, H., Kim, S-H.**, (1998c) Small heat shock protein of *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 9129–9133.
- Kitchen, D. B., Reed, L. H., Levy, R. M** (1992) Molecular dynamics simulation of solvated protein at high pressure *Biochemistry* 31, 10083-10093.
- Klockare, B., Virgin, H. I.** (1983) Chlorophyll(ide) forms after partial phototransformation of protochlorophyll(ide) in etiolated wheat leaves. *Physiol Plant* 57, 28-34.
- Klug, D. D., Whalley, E.**, (1979) Elliptic Boundaries between smectic and nematic phases *J. Chem. Phys.* 1874-1877.
- Kohler, B. E.** (1979) Site selection spectroscopy in: *Moore, C. B. (ed.) Chemical and Biochemical Applications of Lasers*, Academic press New Y. pp 31-58.
- Korn, G. A., Korn, T. M** (1975) Matematikai kézikönyv műszakiaknak. Műszaki könyvkiadó, Budapest
- Kovács, I. Szőke, J. (szerk.)** (1987) Molekulaspektroszkópia, Akadémiai kiadó, Budapest
- Krimm, S., Bandekar J.** (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins *Adv. Protein Chem.* 3, 181-364.
- Kunugi, S., Takano, K., Tanaka, N., Suwa, K., Akashi, M.**, (1997) Effects of pressure on the behavior of the thermoresponsive polymer poly(N-vinylisobutylamide) (PNVIBA) *Macromolecules* 30, 4499-4501.
- Lakowicz, J. R.** (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy (2nd edition) Plenum Press, New Y.
- Laird, B. B., Skinner, J** (1989) Microscopic theory of reversible pressure broadening in hole-burning spectra of impurities in glasses. *Chem. Phys.* 90, 3274-3281

- Lee, D. C., Haris, P. I., Chapman, D., Mitchell, R. C.** (1990) Determination of protein secondary structure using factor analysis of infrared spectra, *Biochemistry* 29, 9185-9193.
- Lesch, H., Schlichter, J., Friedrich, J., Vanderkooi, J. M.** (2004) Molecular probes: What is the range of their interaction with the environment? *Biophys. J.* 86, 467-472.
- Levinthal, C. Y** (1968) Are there pathways of protein folding? *J Chem. Phys.* 65, 44-45.
- Levitt, M., Greer, J.** (1977) Automatic identification of secondary structure in globular proteins, *J. Mol. Biol.* 114, 181-239.
- Litvin, F. F., Belyaeva, O. B.** (1971) Sequence of photochemical and dark reactions in the terminal stage of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthetica* 5, 200-209.
- Mao, H. K., Bell, P. M., Shaner, J. W., Steinberg, D. J** (1978) Specific volume measurements of Cu, Mo, Pd, and Ag and calibration of the ruby R1 fluorescence pressure gauge from 0.06 to 1 Mbar *J. Appl. Phys.* 49, 3276-3282.
- Masuda, T., Takamiya, K** (2004) Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Photosynth Res* 81, 1-29.
- Matagne A., Radford, S.E., Dobson, C.M.** (1997) Fast and slow tracks in lysozyme folding: Insight into the role of domains in the folding process *J Mol Biol* 267(5), 1068-1074.
- Mathis, P., Sauer, K.** (1973) Chlorophyll formation in greening bean leaves during the early stages. *Plant. Physiol.* 51, 115-119.
- Michels, P. C., Hei, D., Clark, D. S.** (1996) Pressure effects on enzyme activity and stability at high temperatures. In: *Enzymes and proteins from hypertermophilic microorganisms.* (Ed. Adams MWW), Academic Press, San Diego-London-Boston-New York-Sydney-Tokyo-Toronto, pp 348-349.
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R., Axelrod, B** (1996) Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4-Å resolution *Biochemistry* 35, 10687-10701.
- Miyazawa, T., Shimanouchi, T., Mizushima, S. I** (1958) Normal Vibration of N-Methylacetamide *J. Chem Phys* 29, 611-615.
- Morishima, I., Kurono, M. and Shiro, Y.** (1986) Presence of Endogenous Calcium ion in Horseradish peroxidase *J. Biol. Chem.* 261, 9391-9399.
- Mysliwa-Kurdziel, B., Franck, F., Ouazzani-Chahdi, M.A., Strzalka, K** (1999) Changes in endothermic transitions associated with light-induced chlorophyllide formation, as investigated by differential scanning calorimetry, *Physiol. Plant.* 107, 230-239.
- Naberhaus, F** (2002) α -Crystallin-Type Heat Shock Proteins: Socializing Minichaperones in the Context of a Multichaperone Network *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 64-93.
- Nagy, K.** (1978) *Kvantummechanika*, Tankönyvkiadó, Budapest
- Nash, D.P., Jonas, J.** (1997) Structure of the pressure-assisted cold unfolded state of ubiquitin. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 238, 289-291.
- Noack, R. A., Holzappel, W. B** (1979) Calibration of the ruby pressure scale at low temperatures *In: High Pressure Science and Technology* ed. K. D. Timmerhaus, M.S. Barber, Plenum press New York. pp. 748-753.

- Noda, I** (1990) Two-dimensional infrared (2D-IR) spectroscopy: Theory and applications. *Appl. Spectrosc.* 44, 550-561.
- Noda, I** (1993) Generalized two-dimensional correlation method applicable to infrared, Raman and other types of spectroscopy *Appl. Spectrosc.* 47, 1329-1336.
- Ogawa, M., Konishi, M.** (1980) Analysis of spectral properties after the Shibata shift by second derivative spectrophotometry, *Plant. Sci. Lett.* 17, 169-173.
- Ogawa, S., Shiro, Y. and Morishima, I.,** (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 674-678.
- Ogunmola, B. B., Zipp, A., Chen, F. and Kauzmann, W.** (1977) Effects of Pressure on Visible Spectra of Complexes of Myoglobin, Hemoglobin, Cytochrome c, and Horse Radish Peroxidase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 1-4.
- Oliver, R. P., Griffiths, W. T** (1982) Pigment-protein complexes of illuminated leaves. *Plant Physiol.* 70, 1019-1025.
- Pain, R. H** (Ed) (2001) Mechanism of Protein Folding, Oxford Univ. Press Oxford.
- Pancoska, P., Yasui, S. C., Keiderling, T. A.** (1991) Statistical analysis of the vibrational circular dichroism of selected proteins and relationship to secondary structures, *Biochemistry* 30, 5089-5103.
- Panick, G., Winter, R.** (2000) Pressure-induced unfolding/refolding of ribonuclease A : static and kinetic Fourier transform infrared spectroscopy study *Biochemistry* 39, 1862-1869.
- Personov, R. I** (1983) Site Selection Spectroscopy of Complex Molecules in Solutions and Its Applications. In *Spectroscopy and excitations dynamics of condensed molecular systems*. in: V.M. Agranovich, and R.M. Hochstrasser, (ed.) North-Holland Amsterdam 555-619.
- Pfeifer H. és Heremans K.** publikátatlan eredmény, személyes közlés.
- Porra, R. J** (1997) Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63, 492-516.
- Press, W.H., Flannery B. P., Teukolsky S. A., Vetterling, W. T.** (1990) Numerical recipes in Pascal. The art of scientific computing, Cambridge University Press, Cambridge
- Privalov, P.L** (1990) Cold unfolding of proteins *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 281-305.
- Rahmelow, K., Huber, W., Ackermann, Th** (1998) Infrared absorbances of protein side chains *Anal. Biochem.* 257, 1-11.
- Raman, B., Rao, C. M.** (1997) Chaperone-like activity and temperature-induced structural changes of α -crystallin. *J. Biol. Chem.* 272, 23559-23564.
- Ravindra, R., Winter, R.** (2003) On the pressure- temperature free energy landscape of proteins. *Chem. Phys. Chem.* 4, 355-365.
- Richardson, III, J.M., Lemaire, S.D., Jacquot, J.-P. Makhatadze, G.I..** (2000). Difference in the Mechanisms of the Cold and Heat Induced Unfolding of Thioredoxin h from *Chlamydomonas reinhardtii* Spectroscopic and Calorimetric Studies. *Biochemistry* 39, 11154-11162.
- Ruan, K., Xu, C., Li, T., Li, J., Lange, R., Balny, C.** (2003) The thermodynamic analysis of protein stabilization by sucrose and glycerol against pressure-induced unfolding *Eur. J. Biochem.* 270, 1654-1661.
- Rubens, P., Heremans, K.,** (2000) Pressure-temperature gelatinization phase diagram of starch an in situ Fourier transform Infrared Study *Biopolymers*, 54, 524-530

- Ryberg, M. Dehesh, K.** (1986) Localization of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in dark-grown wheat (*Triticum aestivum*) by immunoelectron microscopy before and after transformation of the prolamellar bodies, *Physiol. Plant.* 66, 616-624.
- Ryberg, M., Sundqvist, C.** (1982a) Characterization of prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. *Physiol Plant* 56, 125-132.
- Ryberg, M., Sundqvist, C.** (1982b) Spectral forms of protochlorophyllide in prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. *Physiol Plant* 56, 133-138.
- Ryberg, M. Sundqvist, C** (1988) The regular ultrastructure of isolated prolamellar bodies depends on the presence of membrane-bound NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *Physiol. Plant.* 73, 218-226.
- Savitzky, A., Golay, M. J. E** (1964) Smoothing and differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
- Scarlata, S. F** (1996) Effects of Increased Viscosity on the Function of Integral Membrane Proteins In: *High Pressure effects in molecular biophysics and enzymology*. Eds L.J. Harkley, DB. Northop, CA Royer, *Oxford University Press*, Oxford pp. 331-345.
- Selstam, E., Sandelius, A. S.** (1984) A comparison between prolamellar bodies and prothylakoid membranes of etioplasts of dark-grown wheat concerning lipid and polypeptide composition. *Plant Physiol* 76, 1036-1040.
- Sherman, W. F., Stadtmuller, A. A** (1987) Experimental Techniques in High Pressure Research, *John Wiley & Sons Ltd Chichester*.
- Shibata, K** (1957) Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves, *J. Biochem.* 44, 147-173.
- Shiro, Y., Kurono, M., Morishima, I.** (1986) Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J. Biol Chem.* 261 9382-9390.
- Silva, JL., Foguel, D., Royer, C. A.,** (2001) Pressure provides new insights into proteins folding, dynamics and structure *Trends in Biochem, Sci.* 26 612-618.
- Silva, JL., Weber, G** (1988) Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus, *J. Mol. Biol.* 199, 149-59.
- Silva, JL., Weber, G** (1993) Pressure stability of proteins, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 44 89-113.
- Silvera, I. F., Wijngaarden, R. J** (1985) Diamond anvil cell and cryostat for low-temperature optical studies, *Rev Sci Instruments* 56, 121-124.
- Sironval C, Michel-Wolwertz MR, Madsen A** (1965) On the nature and possible functions of the 673 and 684 m μ forms in vivo of chlorophyll. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 344-354.
- Smart, O. S., Goodfellow, J. M., Wallace, B. A** (1993) The pore dimensions of gramicidin A. *Biophys. J.* 65, 2455-2460.
- Smeller, L., Goossens, K., Heremans, K** (1996) High pressure FTIR studies on hemoproteins *High Pressure Science and Technology Ed. WA Trzeciakowski World Scientific Co. Pte. Ltd. Singapore*, pp 863-865.
- Smith, A. T.** (1990) Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca² and heme, *J. Biol. Chem.* 265, 13335-13343.

- Smulders, R. H. P. H., van Boekel, M. A. M., de Jong, W. W.** (1998) Mutations and modifications support a “pitted-exiball” model for α -crystallin. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 187-196.
- Sojka, B., Ludwig, H.** (1994) Pressure induced germination and inactivation of *Bacillus Subtilis* spores, *Pharm. Ind.* 56, 660-663.
- Solymosi, K., Myśliwa-Kurdziel, B., Bóka, K., Strzalka, K., Böddi, B.** (2006) Disintegration of the prolamellar body structure at high concentrations of Hg^{2+} *Plant Biol* 8, 627-635.
- Steiner, J., Termonia, Y., Deltour, J. S** (1972) Comments on smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure *Anal. Chem.* 44, 1906-1909.
- Sundqvist, C., Dahlin, C** (1997) With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes. *Physiol. Plant.* 100, 748-759.
- Susi, H., Byler D. M.** (1987) Fourier transform infrared study of proteins with parallel β -chains *Arch. Biochem. Biophys.* 258 465-469.
- Susi, H., Byler, D. M.,** (1986) Resolution-enhanced Fourier-transform infrared-spectroscopy of enzymes *Methods Enzymol.* 130, 290-311
- Sychev, S. V., Barsukov, L. I., Ivanov, V. T.,** (1993) The double pi-pi 5,6 helix of gramicidin A predominates in unsaturated lipid membranes, *Eur. Biophys. J.* 22, 279-288.
- Takemoto, L., Boyle, D** (1998) The possible role of α -crystallins in human senile cataractogenesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 331-337
- Taniguchi, Y., Suzuki, K.,** (1983) Pressure inactivation of α -chymotrypsin, *J. Phys. Chem.* 87, 5185-5193.
- Taniguchi, Y., Takeda, N.,** (1992) Pressure induced secondary structure of proteins studied by FT-IR *spectroscopy in: High Pressure and Biotechnology*, (Eds: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P.,) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd Vol. 224 pp 115-122.
- Tamura, Y., Gekko, K** (1995) Compactness of thermally and chemically denatured ribonuclease A as revealed by volume and compressibility *Biochemistry* 34, 1878-1884.
- Teale, F. W. J. (1959)** Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. *Biochim. Biophys. Acta* 35, 543.
- Torii, H., Tasumi, M** (1992) Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins *J. Chem Phys.* 96, 3379-3387.
- Townley, H. E., Sessions, R. B., Clarke, A. R., Dafforn, T. R., Griffiths, W. T.** (2001) Protochlorophyllide oxidoreductase: a homology model examined by site-directed mutagenesis. *Proteins* 44, 329-335.
- Tölgyesi, F., Ullrich, B., Fidy, J.** (1999) Tryptophan phosphorescence signals characteristic changes in protein dynamics at physiological temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* 1435, 1-6
- Urry, D. W., Shaw, R. G., Trapane, T. L., Prasad, K. U.,** (1983) Infrared spectra of the gramicidin A transmembrane channel: the single-stranded- β^6 helix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 373-379.
- Van der Cammen, J.C.J.M., Goedheer, J.C.** (1984) A model for the reduction of protochlorophyllide containing three different forms of photoactive protochlorophyllide. In: Protochlorophyllide reduction and greening. (Eds.

- Sironval C, Brouers M) Martinus-Nijhoff/Dr. W. Junk Publ, The Hague-Boston-Lancaster, pp 191-194.
- van Eldik R., Asano, T., Le Noble, W. J** (1989) Activation and reaction volumes in solution 2. *Chem Rev.* 89, 549-688.
- van Montfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C., Vierling, E.**(2001) Crystal structure and assembly of an eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1025-1030
- Veniaminov, S. Yu., Kalnin, N. N.** (1990a) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. spectral parameters of amino acid residue absorption bands, *Biopolymers* 30, 1243-1257.
- Veniaminov, S. Yu., Kalnin, N. N.** (1990b) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α -, β -, and random coil conformations, *Biopolymers* 30, 1259-1271.
- Kalnin, N. N., Baikarov, I. A., Veniaminov, S. Yu.,** (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. III. Estimation of the protein secondary structure, *Biopolymers* 30, 1273-1280.
- Wallace, B. A** (1986) Structure of Gramicidin A *Biophys J.* 49, 295-306.
- Wallace, B. A** (1998) Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *J. Structural Biology* 121, 123-141.
- Weber, G., Drickamer, H. G** (1983) The effect of pressure upon proteins and other biomolecules *Q. Rev. Biophys.* 16, 89-112.
- Weinstein, B. A** (1986) Ruby thermometer for cryobaric diamond anvil cell *Rev. Sci. Instrum.* 57, 910-913.
- Wiktorsson, B., Engdahl, S., Zhong, LB., Boddi, B., Ryberg, M., Sundqvist C** (1993) The effect of cross-linking of the subunits of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase on the aggregational state of protochlorophyllide, *Photosynthetica* 29, 205-218.
- Wiktorsson, B., Ryberg, M., Sundqvist, C** (1996) Aggregation of NADPH protochlorophyllide oxidoreductase pigment complexes is favoured by protein phosphorylation, *Plant Physiol. Biochem.* 34, 23-34.
- Williams, R. W.** (1986) Protein secondary structure analysis using Raman amide I and II spectra, *Methods Enzymol.* 130, 311-331.
- Winter, R., Böttner, M.** (1993) Volumetric properties of model biomembranes. In: High pressure chemistry, biochemistry and materials science. (Eds. Winter R, Jonas J) Kluwer Academic Publ, Dordrecht-Boston-London, pp 545-560.
- Winter, R., Landwehr, A., Brauns, T., Erbes, J., Czeslik, C., Reis, O.** (1996) High-pressure effects on the structure and phase behaviour of model membrane systems. In: High-pressure effects in molecular biophysics and enzymology. (Eds. Harkley JL, Northrop DB, Royer CA) Oxford University Press, New York, Oxford, pp 274-294.
- Wong, P. T. T., Moffat, D. J., Baudais, F. L** (1985) Crystalline quartz as an internal pressure for high-pressure infrared spectroscopy *Appl. Spectrosc.* 39, 733-735.
- Wong, P. T. T., Moffat, D. J** (1989) A new internal pressure calibrant for high-pressure infrared spectroscopy of aqueous systems *Appl. Spectrosc.* 43, 1279-1281.

- Xia, J. Z., Wang, Q., Tatarkova, S., Aerts, T. and Clauwaert, J.** (1996) Structural basis of eye lens transparency : light scattering by concentrated solutions of bovine a-crystallin proteins. *Biophys. J.* 71, 2815-2822
- Zakin, M. R., Herschbach, D. R., (1986) Vibrational frequency shifts induced by molecular compression of pyridine in solution** *J. Chem. Phys.* **85**, 2376-2383
- Zhang, J., Peng, X., Jonas, A., Jonas, J.** (1995) NMR study of the cold, heat, and pressure unfolding of ribonuclease A. *Biochemistry* 34, 8631-8641.
- Zhong, L.B., Wiktorsson, B., Ryberg, M., Sundqvist C** (1996) The Shibata shift, effects of in vitro conditions on the spectral blue shift of chlorophyllide in irradiated isolated prolamellar bodies *J. Photochem. Photobiol., B Biol.* 36, 263-270.
- Zipp, A., Kauzmann, W.,** (1973) Pressure Denaturation of Metmyoglobin, *Biochemistry* 12, 4217-4228.
- Zollfrank, J., Friedrich, J. Fidy, J., Vanderkooi, J.M** (1991) Photochemical holes under pressure: Compressibility and volume fluctuations of a protein. *J. Chem. Phys.* 94, 8600-8603.